

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición y Bromatología III
(Higiene y Tecnología de los Alimentos)



**DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS
LÁCTEAS Y QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y
CABRA, UTILIZANDO ANTICUERPOS
MONOCLONALES, POLICLONALES Y TÉCNICAS
INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Gonzalo Anguita Alegret

Bajo la dirección de los doctores

María Rosario Martín Santos
Bernabé Sanz Pérez
Teresa García Lacarra

Madrid, 2002

6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS Y
QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y CABRA, UTILIZANDO
ANTICUERPOS MONOCLONALES, POLICLONALES Y
TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)**

Memoria que para optar al
grado de Doctor en Veterinaria
presenta el Licenciado Gonzalo
Anguita Alegret

En Madrid, noviembre de 1996



TELF. 34-(9)1-394 37 49

FAX: 34-(9)1-394 37 43

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS, PROFESORA TITULAR DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **“Detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados de oveja y cabra, utilizando anticuerpos monoclonales, policlonales y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)”**, de la que es autor Gonzalo Anguita Alegret, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), bajo la dirección conjunta del catedrático D. Bernabé Sanz Pérez, de la Profesora Ayudante Dra. Teresa García Lacarra y de la que suscribe, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 18 de noviembre de 1996

Fdo.: M^a del Rosario Martín

Fdo.: Teresa García

Fdo.: Bernabé Sanz

Cuando el viaje emprendas hacia Ítaca haz votos porque sea larga la jornada. Llegar allí es tu vocación. No debes, sin embargo, forzar la travesía.

Cavafis

El conejo blanco se caló las gafas y preguntó:
- ¿Por dónde quiere su Majestad que comience?
- Comienza por el comienzo- le dijo el Rey, con toda la gravedad-; continúa con la continuación y finaliza al final. Y luego párate.

Alicia en el país de las maravillas, cap. XII. L. Carroll

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Bernabé Sanz Pérez, entonces Director del Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria de Madrid, le agradezco su ayuda al ofrecerme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en este Departamento.

Muy especialmente mi gratitud a la Prof. Dra. Rosario Martín de Santos, por el esfuerzo y la dedicación demostrados a lo largo de todo el tiempo que duró el trabajo de investigación, transmitiéndome sus análisis e interpretaciones de los resultados obtenidos en las sucesivas etapas de experimentación. A la Prof. Dra. Teresa García Lacarra por su paciencia y atención prestadas, particularmente durante el período de obtención de los anticuerpos monoclonales. Al Prof. Dr. Pablo Hernández Cruza por la supervisión que hizo del trabajo.

Al Profesor Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda como actual Director del Departamento de Nutrición y Bromatología III, por su colaboración para la conclusión de esta tesis.

A la Dra. Marta Calvo por la ayuda que me prestó en el desarrollo de la técnica de FPLC. A las Profesoras Dra. Isabel Cambero y Dra. Almudena Jase por su colaboración en la realización de las técnicas cromatográficas. A la Prof. Dra. Carmen San José por la asistencia continua y las fuentes documentales que me proporcionó y que me fueron de gran ayuda para la realización de mi actividad investigadora. A la Prof. Dra. Isabel González por sus consejos durante el desarrollo de las técnicas electroforéticas e inmunoenzimáticas. A la Dra. Ana Isabel Haza por “las penas y glorias” que compartimos.

A la Dra. Carmen Criado por la ayuda que me prestó en el manejo e inmunización de los conejos. A la Dra. Elena Rodríguez por los anticuerpos policlonales que me proporcionó.

Quiero agradecer a las Profesoras Dra. Teresa Miras Portugal, Dra. Magdalena Torres y Dra. Esmerilda Delicado, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Madrid por despertar en mi la inquietud de la investigación durante el tiempo que permanecí como alumno interno en su departamento. Al Dr. Fernando Saiz y a Carmen de Alba por dirigirme el trabajo experimental que realicé con la beca de introducción a la investigación que me concedió el I.N.I.A.

A la granja Priégola, a la Cooperativa La Colmenareña, y a las queserías La Abulense (en la actualidad Queserías Luxtor) y La Cabezuela, todas ellas ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid, por las muestras de leches y quesos que nos proporcionaron. A Lola Fernández-Villacañas por las muestras de leches de oveja que me proporcionó procedentes de granjas ubicadas en Ciudad Real.

Deseo agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca dentro del Plan de Formación de Profesorado y de Personal Investigador.

A Luis Cintas, Pilar Casaus, Manuela Fernández, María Marín y a todos los doctorandos que me acompañaron durante el tiempo que duró la realización de este trabajo de investigación, y muy especialmente a Carmen Pin por los buenos momentos que compartimos.

A la Dra. Carmen Galindo, como Directora Técnica de ALKAID, por sus consejos y por la confianza que ha depositado en mí desde que inicié mi actividad en la empresa privada y a mis compañeros Eduardo Palú y Eloy Quiñones, por su comprensión y compañerismo. A Yolanda Fernández y a Javier Fidalgo del Departamento de Calidad de ALCAMPO por ofrecerme la oportunidad de conocer el sistema de calidad de las empresas alimentarias españolas.

A Eville & Jones, especialmente a Juan Miguel Avila, al MHS (Meat Hygiene Service) y al MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), por la confianza depositada en mí al contratarme como OVS (Official Veterinary Surgeon) para trabajar en los mataderos de Reino Unido.

A mis compañeros de estudios universitarios Alvaro Fernández-Fournier, Cristina Jüttner y Alicia Aranaz, por todos los consejos y buenos momentos compartidos tanto durante la carrera como después durante la iniciación a la investigación.

Muy especialmente a mis amigos Carlos Leguina, Andrés Fernández-Baena, Carlos Alonso, Ingrid Acebal y Yolanda Sáez. A Augusto Santini, a mis hermanos Arancha, Bruno y Alvaro y a mis padres por todo su apoyo y comprensión.

ÍNDICE

	PÁGINA
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
II. INTRODUCCIÓN	6
II. 1. PRODUCCIÓN DE LECHE EN LA UNIÓN EUROPEA	9
II. 2. PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACA EN ESPAÑA	10
II. 3. PRODUCCIÓN DE LECHE DE OVEJA Y CABRA EN ESPAÑA	11
II. 4. COMERCIO EXTERIOR DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	12
II. 5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE	13
5. 1. PROTEÍNAS	14
1. Polimorfismo genético de las proteínas lácteas	15
2. Estructura primaria de las caseínas	17
3. Estructura secundaria y terciaria de las caseínas	20
4. Estructura de la micela de caseína	20
5. Diferencias de composición entre las caseínas de las leches de vaca, oveja y cabra	24
6. Proteínas séricas de la leche	26
5. 2. LÍPIDOS	30
5. 3. CARBOHIDRATOS	31
5. 4. SALES	31
5. 5. OTROS COMPONENTES	31
II. 6. MODIFICACIONES DE LAS CASEÍNAS POR EFECTO DEL CALENTAMIENTO DE LA LECHE	32
II. 7. TRANSFORMACIONES DE LAS CASEÍNAS POR EFECTO DE LA PROTEOLISIS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO	34
7. 1. REACCIONES DE DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	34

7. 2. REACCIONES ENZIMÁTICAS DE COAGULACIÓN EN LA FORMACIÓN DE LA CUAJADA	34
7. 3. REACCIONES PROTEOLÍTICAS DESARROLLADAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO	35
II. 8. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR EL ORIGEN ESPECÍFICO DE LA LECHE EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS	37
8. 1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	38
8. 2. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS	40
1. Electroforesis de las caseínas	40
2. Electroforesis de las proteínas del suero	41
3. Isoelectroenfoco	42
4. Electroforesis capilar	43
8. 3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	44
1. Inmunoprecipitación	45
2. Inmunodifusión	45
3. Inhibición de la hemaglutinación	47
4. Inmunoelectroforesis	47
5. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
III. 1. MATERIALES	55
1. 1. MATERIAL DE LABORATORIO	55
1. 2. MATERIAL BIOLÓGICO	57
1. Origen de las muestras	57
2. Obtención de los inmunosueros	58
3. Células de mieloma	58
1. 3. PRODUCTOS Y REACTIVOS	59
III. 2. MÉTODOS	59
2. 1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS	59

1. Extracción de las caseínas de la leche de vaca	59
2. Separación de las fracciones caseínicas de la leche de vaca mediante cromatografía líquida de alta eficacia (FPLC)	59
3. Determinación de la proteína	61
2. 2. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	62
1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	62
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando un PhastSystem™	66
3. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida con urea (UREA-PAGE)	68
2. 3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	71
1. Pauta de inmunización	71
2. Fusión celular	74
3. Selección de los hibridomas	75
4. Evaluación de los hibridomas	77
5. Clonación de los hibridomas	77
6. Expansión y congelación de los hibridomas	78
7. Obtención a gran escala de los anticuerpos monoclonales ..	79
8. Tipificación de los anticuerpos monoclonales	79
9. Purificación parcial de los anticuerpos	79
10. Determinación de la concentración de inmunoglobulinas del líquido ascítico purificado	80
11. Conjugación de los anticuerpos purificados con la digoxigenina	80
2. 4. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES ..	82
1. Pauta de inmunización	82
2. Sangría final	83
3. Obtención y conservación del suero	84
4. Purificación parcial de los inmunoseros	84
2. 5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	84
1. Técnica del ELISA indirecto	84

2. Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina	87
3. Técnica del ELISA competitivo	88
4. Técnica del ELISA sandwich	89
5. Técnica del ELISA sandwich utilizando el sistema de amplificación digoxigenina-antidigoxigenina	91
6. Técnica del inmunoblotting	93
- Transferencia de las proteínas desde un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) a una membrana de nitrocelulosa	94
- Transferencia de las proteínas desde un gel de poliacrilamida con urea a una membrana de nitrocelulosa	96
7. Técnica del ELISA indirecto en paletas	97
IV. RESULTADOS	101
IV. 1. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA	102
IV. 2. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA	106
IV. 3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA ..	108
V. 4. ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL AH4 PARA RECONOCER A LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO	113
IV. 5. DETECCIÓN DE LA LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS POR TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA) ..	113
1. Técnica del ELISA indirecto	113
2. Técnica del ELISA competitivo	120
IV. 6. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA SOMETIDA A DISTINTOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS, EN MEZCLAS LÁCTEAS POR LA TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO	122

IV. 7. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE LECHE DE VACA EN QUESOS DE OVEJA Y CABRA, POR TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)	124
1. Técnica del ELISA indirecto	124
2. Técnica del ELISA competitivo	126
3. Técnica del ELISA sandwich	129
IV. 8. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LECHE Y QUESO DE OVEJA POR UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS	135
V. DISCUSIÓN	140
V. 1. PURIFICACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (FPLC)	141
V. 2. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS CASEÍNAS DE VACA PURIFICADAS POR FPLC, POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS UTILIZANDO EL APARATO PHASTSYSTEM™	142
V. 3. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS CASEÍNAS PURIFICADAS POR FPLC UTILIZANDO TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)	144
V. 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE VACA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE INMUNOBLOTTING	145
V. 5. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS FRENTE A LAS CASEÍNAS DE VACA.....	147
V. 6. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO	151
V. 7. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA COMPETITIVO	155

V. 8. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA SANDWICH	157
V. 9. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LECHES Y QUESOS DE OVEJA POR UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA RÁPIDA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS.....	158
VI. CONCLUSIONES	160
VII. TRABAJO FUTURO	163
VIII. BIBLIOGRAFÍA	166

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

El queso es un alimento que ha estado presente en la civilización humana desde tiempos remotos. Desde un punto de vista nutricional tiene un gran interés, ya que es una fuente de proteínas, vitaminas y minerales y en muchos casos de grasa (Varnam y Sutherland, 1994). Asimismo, el queso constituye una amplia oferta gastronómica que se ve aumentada por el valor añadido de otros ingredientes que se incorporan en su elaboración. Existe una gran variedad de formas y presentaciones del queso que son producto de la expresión cultural de los pueblos. Desde los comienzos del siglo XX, la tecnología ha permitido la difusión de un producto que sin perder las cualidades que le diferenciaban, era a su vez higiénico y conservable en el tiempo.

En España, en los últimos años, la mayor demanda de productos agrícolas y ganaderos tradicionales, ha motivado el apoyo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para el fomento y desarrollo de la calidad agroalimentaria, que principalmente se ha traducido en la creación de las “Denominaciones de Origen”. Este distintivo garantiza la procedencia, composición y condiciones de elaboración de los alimentos que lo ostentan. Los quesos que en nuestro país poseen “Denominación de Origen” son: el Manchego, Roncal, Idiazábal, Zamorano y la Serena elaborados con leche pura de oveja; Cantabria, Mahón y Tetilla elaborados con leche pura de vaca y los quesos Cabrales y Liébana (Picón, Ahumado y Quesucos) de mezcla de leches de vaca, oveja y cabra. El control necesario para contrastar la calidad de los productos con “Denominación de Origen” se lleva a cabo mediante los Consejos Reguladores, la Administración y las empresas privadas. Este control no sólo debe asegurar que los quesos sean inocuos y nutritivos, sino que además, han de ser genuinos y deben estar correctamente etiquetados. La Administración debe asegurar al consumidor que el valor añadido que paga por un producto de calidad contrastada, se corresponde con aquellas condiciones que le son exigibles por ostentar esa denominación.

Con el fin de regular a nivel comunitario la aplicación de las denominaciones de origen y de las indicaciones geográficas, garantizar la competencia leal entre fabricantes de los productos que llevan este tipo de indicaciones y conferir una mayor credibilidad de estos productos a los ojos del consumidor, se adoptó el Reglamento CEE 2081/92 de 14 de julio (DOCE de 24 de julio de 1992) por el que se establece las normas relativas a la protección de las denominaciones de origen e indicaciones geográficas de los productos agrícolas destinados a la alimentación humana. Recientemente, el Reglamento CE 1107/96 de 12 de junio (DOCE de 21 de junio de 1996) aprueba una lista de productos con denominación de origen (DOP) e indicaciones geográficas (IGP) aceptados a nivel comunitario. Este registro oficial permanece aún abierto y se prevee su entrada en vigor para junio de

1997. España es el 4º país con un mayor número de productos aprobados y los quesos con denominación de origen que se incluyen son: Cabrales, Idiazábal, Mahón, Picón-Bejes Tresviso, Cantabria, la Serena, Manchego, Zamorano, Roncal y Quesucos.

En la elaboración de los quesos, la sustitución de la leche de oveja por otras más baratas como las de vaca y cabra es una práctica fraudulenta usual en nuestro país. Asimismo, la leche de vaca se utiliza frecuentemente en la elaboración de quesos de cabra. Esta práctica de fabricación es aún más difícil de regular, ya que en la Unión Europea, sólo Francia posee una reglamentación protectora para quesos con “Denominación de Origen” fabricados con leche pura de cabra (Le Jaouen y Toussaint, 1993). Ya que el consumo de quesos elaborados con leches no declaradas en el etiquetado del producto puede provocar reacciones alérgicas en individuos sensibles (Taylor, 1986; Miller, 1987), y dado que la composición de las leches influye en las características organolépticas del queso (Hernández y col., 1994), la sustitución de las leches de oveja y cabra por otras más baratas en la elaboración de los quesos, constituye un fraude.

Los productores de quesos deben declarar en los registros oficiales el porcentaje de los distintos tipos de leche utilizados en la fabricación. Además, la Orden de 29 de noviembre de 1985 (BOE de 6 de diciembre de 1985), por la que se aprueban las Normas de Calidad para los quesos y los quesos fundidos, tanto en el apartado 5 sobre la denominación del queso, como en el apartado 12 sobre el etiquetado, especifican la obligatoriedad de incluir en la etiqueta el nombre de la especie o especies de las que procede la leche en orden decreciente de proporciones.

En el Real Decreto 1533/91, de 18 de octubre (BOE de 30 de octubre de 1991), se aprueban como métodos oficiales de análisis de la leche y productos lácteos, para la detección de las especies de leches en mezclas lácteas y quesos, las técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida y las técnicas de inmunodifusión radial. Recientemente, en el Reglamento CE 1081/96, de 14 de junio (DOCE de 15 de junio de 1996) se establece una técnica de isoelectroenfoque como método de referencia para la detección de leche de vaca en quesos a base de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala o sus mezclas. Aunque estas técnicas presentan buenos niveles de sensibilidad, su aplicación práctica está limitada porque la preparación de las muestras es costosa, se precisan grandes cantidades de inmunosuero purificado y su realización es laboriosa.

Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), sin perder los niveles de sensibilidad y especificidad obtenidos por otras técnicas, permiten conseguir altos niveles de automatización por su rapidez, simplicidad y bajo coste. La mayoría de los métodos de ELISA que han sido desarrollados para detectar la incorporación de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados, emplean anticuerpos policlonales obtenidos frente a proteínas del suero (García y col., 1990; 1991; 1993), caseínas (Rodríguez y col., 1990; 1993) o péptidos cortos obtenidos a partir de caseínas (Bitri y col., 1993; Rolland y col., 1993). El procedimiento de obtención de los anticuerpos policlonales permite disponer de cantidades limitadas de inmunosuero con afinidad y especificidad idénticas. Sin embargo, la utilización de anticuerpos policlonales presenta con frecuencia el inconveniente de presentar reacciones cruzadas frente a proteínas distintas de aquéllas que se emplearon en su obtención, y por tanto, para la eliminación de los anticuerpos responsables de estas reacciones cruzadas inespecíficas, se precisa la utilización de técnicas de purificación costosas.

La tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975) resuelve los problemas que presenta el uso de anticuerpos policlonales al permitir la obtención ilimitada de anticuerpos monoclonales de afinidad y especificidad constantes. A pesar de que varios grupos de investigación han obtenido anticuerpos monoclonales frente a las proteínas del suero (Levieux y Venien, 1994) y frente a las caseínas de la leche (Nagaune y col., 1988; Feng y Cunningham-Rundles, 1989; Kuzmanoff y col., 1990a; Leung y col., 1991; Oudshoorn y col., 1994), en estos trabajos no se evalúa la especificidad de los anticuerpos obtenidos para diferenciar leches de distintas especies animales. La detección y cuantificación de la leche de vaca añadida a las leches y quesos de oveja y cabra por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), precisa el empleo de anticuerpos que reaccionen específicamente frente a las proteínas de la leche de vaca sin presentar reacciones cruzadas frente a las leches de otras especies. Por ello, en este trabajo se propone la obtención de anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de vaca con la finalidad de emplearlos en las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar y cuantificar la adición de leche de vaca a las leches y quesos de oveja y cabra de una forma rápida y precisa.

Dado el interés que suscita la aplicación de estas técnicas en los centros de producción lechera e industrias lácteas, se propone asimismo el desarrollo de una prueba de campo que permita detectar sustituciones fraudulentas de leches en mezclas lácteas y quesos, de una forma rápida, sencilla y económica y que no requiera infraestructura laboratorial.

Para alcanzar los objetivos descritos ha sido necesario desarrollar previamente los siguientes objetivos parciales:

1. Separación de las distintas fracciones caseínicas de la leche de vaca mediante cromatografía líquida de alta resolución (FPLC).
2. Caracterización de las fracciones aisladas por FPLC mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando el sistema Phast-System.
3. Caracterización inmunológica de las fracciones de la caseína aisladas por FPLC utilizando anticuerpos policlonales anti-caseínas de leche de vaca (1) y técnicas inmunoenzimáticas de ELISA e inmunoblotting.
4. Obtención de anticuerpos policlonales por inmunización de varios lotes de conejos con la fracción β -caseína que resultó ser la más antigénica.
5. Inmunización de ratones con la β -caseína y selección de hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de leche de vaca.
6. Utilización de los anticuerpos monoclonales y policlonales obtenidos en la *detección y cuantificación de la leche de vaca añadida a las leches crudas y quesos madurados de oveja y cabra empleando diversas técnicas inmunoenzimáticas.*

(1) Se trata de un inmunosuero obtenido y purificado por Rodríguez y col., (1993).

INTRODUCCIÓN

El Código Alimentario Español define a la leche natural como el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. En el Real Decreto 1.679/94 (BOE de 24 de septiembre de 1994) por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos, se define la leche cruda como la leche producida por la secreción de la glándula mamaria de vacas, ovejas, cabras o búfalas que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente.

La leche de vaca es un líquido opaco, de color blanco a blanco amarillento, color que está determinado por la dispersión y absorción de la luz por las gotitas de grasa y las micelas de proteína. El color amarillento se debe a la presencia de β -carotenos de la fase oleosa y a la riboflavina de la fase acuosa. El sabor es ligeramente dulce y el olor es inespecífico (Belitz y Grosch, 1988).

En España, se elaboran exclusivamente con leche de vaca los siguientes quesos:

- En Galicia: queso de Arzúa, Tetilla, San Simón y Cebreiro.
- En Castilla y León: queso de la Armada y el de León.
- En Asturias: Afuega'l Pitu, Beyos (también puede elaborarse con leche de cabra), Casín, Genestoso, queso de la Peral y Urbies.
- En Huesca: queso de Benasque.
- En Cantabria: Cantabria, Pasiego y Vidiago.
- En Menorca: Mahón.
- En Lérida: el del Valle de Arán y la Selva en Gerona.

La leche de oveja es de un color blanco nacarado, como la porcelana. Posee una opacidad más marcada que las leches de vaca y cabra y su viscosidad es mayor que la de la leche de vaca. Los quesos elaborados con leche de oveja tienen un gusto y aspecto característicos, su pasta es más blanda y no suelen presentar sabores amargos, hecho que se debe a que contienen menos α s-caseínas con respecto al contenido total de caseínas que la leche de vaca.

Con leche pura de oveja se elaboran los siguientes quesos:

- En Castilla y León: Castellano, Zamorano, La Bureba en Burgos y Oropesa en Toledo.
- En Castilla-La Mancha: Manchego.

- En Extremadura: el queso de Cáceres, La Serena y la Torta del Casar.
- En Huesca: Ansó-Hecho.
- En el País Vasco: Gaztazarra e Idiazábal.
- En Andalucía: Pedroches en Córdoba.
- En Mallorca: Mallorquín.
- En Navarra: Roncal.
- En Cataluña: Serrat y Tupí.

La leche de cabra posee un color blanco mate mucho más marcado que el de la leche de vaca al no contener apenas carotenos. Tiene un olor neutro, pero tras su conservación en refrigeración adquiere un sabor característico. Su viscosidad es menor que la de la leche de vaca.

Los quesos que se elaboran exclusivamente con leche de cabra son:

- En Andalucía: Alhama de Granada, Aracena de Huelva, el de Málaga, el de Cádiz y el de Sierra Morena en Sevilla.
- En Extremadura: Acehuche, Gata-Hurdes, Ibores, Quesailla y de La Vera.
- En Cáceres, Toledo y Ciudad Real: el de La Siberia.
- En Teruel: Albarracín.
- En Avila: el del Tiétar.
- En León: Valdeteja.
- En Alicante: el de Alicante.
- En Asturias: el de Babia y Laciana y el Buelles.
- En Logroño: Camerano.
- En Canarias: Conejero, Herreño, Majorero y Palmero.
- En Cataluña: Garrotxa y Montsec.
- En Murcia: el de Murcia y el de Murcia al Vino.

Los quesos que se elaboran con mezclas de leches de distintas especies son:

- En Asturias: Queso Ahumado de Áliva, Picón, Pido y Gamonedo (mezcla de vaca, oveja y cabra) y Quesuco (mezcla de vaca y oveja).
- En Cantabria: Cabrales y Peñamellera (mezcla de vaca, oveja y cabra) y Porrúa (mezcla de vaca y oveja).
- En Andalucía: el de la Calahorra en Granada y el de Grazalema en Cádiz (mezcla de oveja y cabra).
- En Valencia y Castellón: Cassoleta (mezcla de oveja y cabra).
- En Teruel y Castellón: Tronchón (mezcla de oveja y cabra).
- En Valencia y Alicante: Servilleta (mezcla de oveja y cabra).

- En Canarias: Flor de Guía (mezcla de oveja y vaca), el de La Gomera (mezcla de oveja y cabra) y el de Tenerife (mezcla de vaca, oveja y cabra).
- En Cataluña: Mató (mezcla de vaca y cabra).
- En Alicante: La Nucía (mezcla de oveja y cabra).
- En toda España: Villalón y Burgos (mezcla de vaca y oveja).

II. 1. PRODUCCIÓN DE LECHE EN LA UNIÓN EUROPEA

En el Tratado de Roma (1957), por el que se constituyen las Comunidades Europeas se describían como objetivos de la Política Agrícola Común el asegurar a la población agrícola unos ingresos equitativos a los de otras actividades no agrícolas a través de medidas que permitieran sostener los precios, estabilizar los mercados y garantizar el abastecimiento de productos alimenticios a precios razonables para los consumidores. Para cumplir dichos objetivos se estableció la Organización Común del Mercado de la leche y productos lácteos que estaba dotada de mecanismos de regulación de precios, concesión de ayudas para determinados productos, financiación del almacenamiento privado de productos y regímenes de intercambio con países terceros para reducir las importaciones y favorecer las exportaciones. Estas medidas protectoras del sector lácteo comunitario, provocaron un crecimiento acelerado de la producción de leche que originó excedentes de leche en polvo y mantequilla. En consecuencia, en una reunión del Consejo de Ministros de Agricultura de 1984, se implantó un régimen de cuotas lecheras que tenía como objetivo limitar la producción de leche aplicando una tasa que debían pagar los ganaderos por las cantidades de leche y productos lácteos que entregasen a los compradores, por encima de su cuota individual. Dicha cantidad o cuota se asignaba en función de la leche y productos lácteos que hubieran vendido directamente en un año de referencia, que para España era 1985. Como consecuencia de la evolución del mercado, la cuota global comunitaria y la de todos los estados miembros han sufrido reducciones sucesivas. El régimen de cuotas se ha mostrado eficaz en el control del incremento de la producción de leche y ha contribuido a mantener los excedentes de leche en polvo y mantequilla dentro de los límites aceptables. La aplicación del régimen de cuotas ha determinado la disminución del número de explotaciones que se compensa por el aumento del tamaño de las mismas y la disminución del censo de vacas lecheras compensado por el aumento de sus rendimientos lecheros.

En la Unión Europea, la participación de la producción de leche en la producción final agraria difiere ampliamente de unos países a otros, ya que mientras que en los países del sur esta participación es inferior al 12 %, en los del norte supera el 20 %. La importancia del sector lácteo es superior a la que

se deriva de estas cifras ya que es preciso considerar el componente social e industrial del mismo. En 1991, el número total de empresas de tratamiento y transformación de leche en la Unión Europea era de 6.159 con una capacidad media de 16.000 Tm, registrándose la mayor capacidad en Holanda y Dinamarca y la menor en Grecia e Italia con 1.100 y 4.100 Tm respectivamente. En España, existen alrededor de 460 empresas con una capacidad media de 7.200 Tm.

El volumen de leche de vaca producido en 1993 en el conjunto de todos los países de la Comunidad Europea fue de 110 millones de Tm. El primer productor de leche de vaca fue Alemania con 28,2 millones de Tm, seguido de Francia con 24,9 millones de Tm y el Reino Unido con 14,7 millones de Tm. El volumen de leche de oveja y cabra producido en el mismo período fue respectivamente de 1,8 y 1,5 millones de Tm. Los tres primeros productores de leche de oveja fueron Italia, Grecia y España con 650, 620 y 275 miles de Tm y, de leche de cabra, Grecia, España y Francia con 460, 430 y 417 miles de Tm respectivamente.

II. 2. PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACA EN ESPAÑA

En 1995, el número total de vacas de ordeño disminuyó un 2 % respecto al censo de 1994, situándose en la actualidad en 1.351.182 cabezas. Desde 1982, año en el que el censo de vacas de ordeño alcanzó los 2.032.000 cabezas, se comprueba que la tendencia descendente del número de efectivos lecheros persiste en la actualidad, aunque la mejora genética se ha traducido en un mayor rendimiento por vaca y año, hecho que queda demostrado si comparamos los rendimientos que se alcanzaban en 1982, próximos a los 2.927 litros y los alcanzados en 1993 cercanos a los 4.244 litros. El aumento de los rendimientos lecheros por vaca y año, determina que en el período de 1982 a 1993 no se hayan producido variaciones acusadas en los volúmenes de producción láctea (de 5,947 millones de Tm en 1982 a 5,974 millones de Tm en 1993). No obstante, la producción total de leche de vaca en 1995 que alcanzó cifras de 5,8 millones de Tm demuestra una disminución de unas 100.000 Tm con respecto a 1993.

En 1995, el número de explotaciones dedicadas a la producción de leche de vaca asciende a 132.565, de las cuales 124.351 entregan la leche a las industrias, 7.090 lo hacen tanto a las industrias lácteas como a ventas directas y solamente 1.124 venden directamente su producción a los consumidores. El volumen de leche de vaca entregado por los ganaderos a las industrias lácteas durante 1995 asciende a más de 5,2 millones de Tm. Estas cifras demuestran que el volumen de leche vendida directamente por los productores en sus explotaciones ha descendido siguiendo la tendencia de los últimos años, que se

explica por las mayores exigencias higiénico-sanitarias y los cambios experimentados en los hábitos de consumo de los españoles.

La dimensión de las explotaciones de ganado vacuno demuestra que es un sector atomizado en el que predominan las ganaderías pequeñas (el 90 % tiene menos de 20 vacas y el 70 % menos de 10). No obstante, en la actualidad se observa que el número de explotaciones disminuye y que la dimensión media de cada explotación aumenta.

El análisis regional de la producción total de leche de vaca, demuestra que de los 5,9 millones de Tm de leche producidos en 1993, Galicia es la principal comunidad productora con 1,8 millones de Tm, seguida por Castilla y León con 912 miles de Tm y por Cataluña y el Principado de Asturias con 627 y 623 miles de Tm. Por provincias, La Coruña y Lugo son las principales productoras de leche de vaca con 760 y 740 miles de Tm, seguidas por el Principado de Asturias y Cantabria con 623 y 502 miles de Tm.

El precio medio percibido por el ganadero productor de leche de vaca en 1995 experimentó un incremento en relación a 1994 alcanzando las 45,32 pesetas por litro; no obstante se aprecian variaciones significativas determinadas por las bonificaciones y penalizaciones que los empresarios imponen al precio de la leche en función del volumen entregado, el rendimiento graso y proteico y la calidad bacteriológica de la misma.

II. 3. PRODUCCIÓN DE LECHE DE OVEJA Y CABRA EN ESPAÑA

Las entregas de leche de oveja y cabra a la industria láctea en 1995, ascendieron a 313,2 y 320,6 miles de Tm, destinándose en su mayor parte, a la elaboración de quesos puros o quesos de mezcla. Se comprueba una disminución apreciable de la producción con respecto a la alcanzada en 1993, con 334 miles de Tm de leche de oveja y 394 miles de Tm de leche de cabra.

De un total de 334 miles de Tm de leche de oveja producidas en 1993, Castilla y León es la principal comunidad productora con 221 miles de Tm, seguida de Castilla-La Mancha con 80 miles de Tm. Por provincias, Valladolid y Zamora son las principales productoras, con 62 y 56 miles de Tm, respectivamente.

De un total de 393 miles de Tm de leche de cabra producidos en 1993, Andalucía destaca con una producción anual de 202 miles de Tm, siendo las provincias de Almería y Málaga las principales productoras con 48 miles de Tm, seguidas por Cáceres con una producción anual que alcanza los 43 miles de Tm.

El precio medio que percibieron los ganaderos de leche de oveja en 1993 alcanzó las 114,08 pesetas por litro y los de leche de cabra las 55,32 pesetas por litro. De 1993 a 1995 se observa una tendencia al alza de los precios que perciben los productores de leche de oveja y de cabra.

En 1993 se entregaron 311 miles de Tm de leche de oveja y 321 miles de Tm de leche de cabra a las industrias lácteas para fabricar queso.

II. 4. COMERCIO EXTERIOR DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Aunque la producción nacional permite el abastecimiento del mercado, se vienen efectuando importaciones de leche y productos lácteos para conseguir la total cobertura del mismo. El volumen de importaciones efectuadas durante 1995 supera las 460.000 Tm, de las cuales casi el 60 % se refieren a la leche líquida. En segundo lugar se encuentran los quesos con 78.300 Tm, seguidos de la leche condensada y evaporada, así como de la leche en polvo. En última posición en cuanto a volúmenes importados se sitúa el lactosuero con 4.387 Tm. Los países de la Comunidad Europea constituyen los principales abastecedores de leche y productos lácteos de nuestro país, destacando Francia, Países Bajos, Alemania, Portugal y Austria. De las importaciones procedentes de países terceros destacan las de Australia y Nueva Zelanda, aunque los volúmenes son reducidos; así como las importaciones de leche desnatada en polvo de Estonia, Lituania, Polonia y la República Checa.

El volumen de las exportaciones es menos significativo que el relativo a las importaciones. En 1995 se exportaron 119.777 Tm, siendo la mayor parte en forma de leche líquida (84.326 Tm) seguidas de los quesos (17.785 Tm) y de la leche condensada y evaporada. Los principales destinatarios de nuestros productos son los países de la Comunidad Europea que reciben más del 85 % de las exportaciones españolas (100.044 Tm). De países terceros, son Cuba, República Dominicana, Angola, Guinea, Argelia, Túnez, Malasia y Estados Unidos los principales receptores, limitándose en algunos casos como el de Estados Unidos a la importación de quesos.

España no es una potencia lechera, ni por el volumen de producción y su participación en la Producción Final Agraria, ni por la propia estructura del sector, ya que tanto a nivel de la producción de leche como a nivel de su tratamiento y transformación, predominan la pequeña dimensión y las deficiencias tecnológicas.

Con anterioridad a la adhesión española a la Comunidad Europea, el sector lácteo evolucionaba lentamente por el crecimiento del consumo interior

sin que tuviera presencia en los mercados exteriores. La coincidencia de la adhesión con la implantación en 1984 del régimen de cuotas que tomaba como base la cantidad de leche y productos lácteos comercializados en el año 1981 o 1983, determinaron que la cuota global asignada a nuestro país se limitase a las cantidades comercializadas en el mercado nacional, incluido el déficit ya existente de leche líquida, leche en polvo y en mayor medida de quesos de vaca. La situación es más favorable para los quesos de leche de oveja y cabra que no se ven afectados por el régimen de cuotas y junto a los quesos de mezcla, tienen buena aceptación por el consumidor español y por tanto esta producción quesera puede resistir bien la competencia del exterior.

A esta situación deficitaria hay que añadir que con los compromisos de la Ronda Uruguay que adquirió la Unión Europea en 1994 dentro del Acuerdo General sobre Aranceles y Comercio (GATT), van a reducirse las ayudas a las exportaciones que junto con la falta de una implantación firme en el mercado mundial de nuestros productos elaborados, dificultará el desarrollo de las exportaciones españolas. Con los compromisos de la Ronda Uruguay, el sector lácteo se verá obligado a trabajar en condiciones de mayor competitividad y para ello, es preciso realizar mejoras tecnológicas, adecuar las dimensiones de las empresas, investigar nuevos productos, racionalizar los aprovisionamientos y mejorar la calidad de los productos, factores que con frecuencia son asignaturas pendientes para el sector lácteo de nuestro país.

II. 5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE

Los principales componentes de la leche son el agua, los lípidos, los carbohidratos, las proteínas y las sales. Estos componentes se encuentran distribuidos en forma de emulsión, suspensión y solución en un equilibrio físico complejo. La grasa se encuentra en forma de glóbulos grasos, rodeados por una membrana, que están emulsionados en el suero lácteo. Las moléculas de proteína se encuentran dispersas en el suero lácteo en forma de partículas que se denominan micelas, constituidas principalmente por sales cálcicas de las caseínas. Además, en el suero lácteo están disueltas diversas proteínas, carbohidratos, sustancias minerales y otros compuestos.

Aunque cualitativamente la composición y propiedades de la leche son constantes, los estudios desarrollados por algunos autores para determinar la composición de la leche a lo largo del tiempo, han demostrado que existen variaciones considerables en los contenidos de proteína y grasa de la leche (Tocher, 1925; Herrington y col., 1972). Estas variaciones se atribuyen a diversos factores como son: la herencia genética, el ciclo de lactación, la edad, la alimentación, la temperatura ambiental, la época del año, el estado de salud y el procedimiento de lactación.

La calidad de los quesos está determinada por la relación caseína/grasa de la leche que se utiliza en su elaboración, ya que una desviación del contenido de caseína o grasa de la leche produce cambios significativos en la textura de los quesos (Scott, 1991). Así por ejemplo, el cambio de alimentación de invierno a pasto de primavera, se traduce en un incremento del contenido de caseína y de la dureza del gel caseínico. Asimismo la leche que producen las vacas que se alimentan con trébol blanco es más rica en caseína total y en caseínas α_s y β , y por tanto, da un gel caseínico más duro que la de las vacas que se alimentan con raigrás. El período de lactación también determina la dureza del gel caseínico en la elaboración del queso. A lo largo de las primeras semanas, la disminución de la concentración en caseína, Ca y fósforo inorgánico, al igual que las variaciones relativas de las caseínas, producen una disminución sensible de la dureza del gel. La dureza del gel es mayor en las leches a la mitad de la lactación. Las leches al final de la lactación coagulan más difícilmente y dan geles más blandos, debido a la fuerte actividad de la plasmina.

En la actualidad, en las industrias elaboradoras de queso es corriente normalizar la composición de la leche incorporando nata y leche en polvo, ya que si el procedimiento de fabricación no se ajusta adecuadamente a lo largo del año, las variaciones estacionales en la composición de las leches de quesería pueden provocar dificultades durante la elaboración. Más difícil les resulta a las industrias asegurar el origen específico de las leches en los quesos de mezcla debido al déficit existente de leches de oveja y cabra, que se explica por la acusada estacionalidad de ambas producciones.

II. 5. 1. PROTEÍNAS

La fracción esencial de los compuestos nitrogenados es la proteica, que representa el 95 % del nitrógeno total de la leche, aproximadamente un contenido de 32, 7 g de proteínas por litro (Goursaud, 1991). Las proteínas de la leche se separan principalmente en dos grupos mediante una acidificación de la misma hasta alcanzar un valor de pH de 4,6 (punto isoelectrico) que da lugar a la formación de una fracción precipitada constituida por las caseínas y otra parte que queda en el sobrenadante que son las proteínas del suero. Las caseínas constituyen la fase micelar inestable de la leche, compuesta de partículas sólidas en suspensión, que difunden la luz y dan a la leche su aspecto blanco opaco. Las caseínas están constituidas por cuatro tipos de cadenas polipeptídicas: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -, que se asocian con el calcio y el fosfato en micelas de 20-300 μ m de diámetro (Jenness, 1988). Las proteínas del suero constituyen la fase soluble estable de la leche y se compone de un grupo diverso que incluye la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina, la lisozima, la lactoferrina y las inmunoglobulinas.

II. 5. 1. 1. Polimorfismo genético de las proteínas lácteas

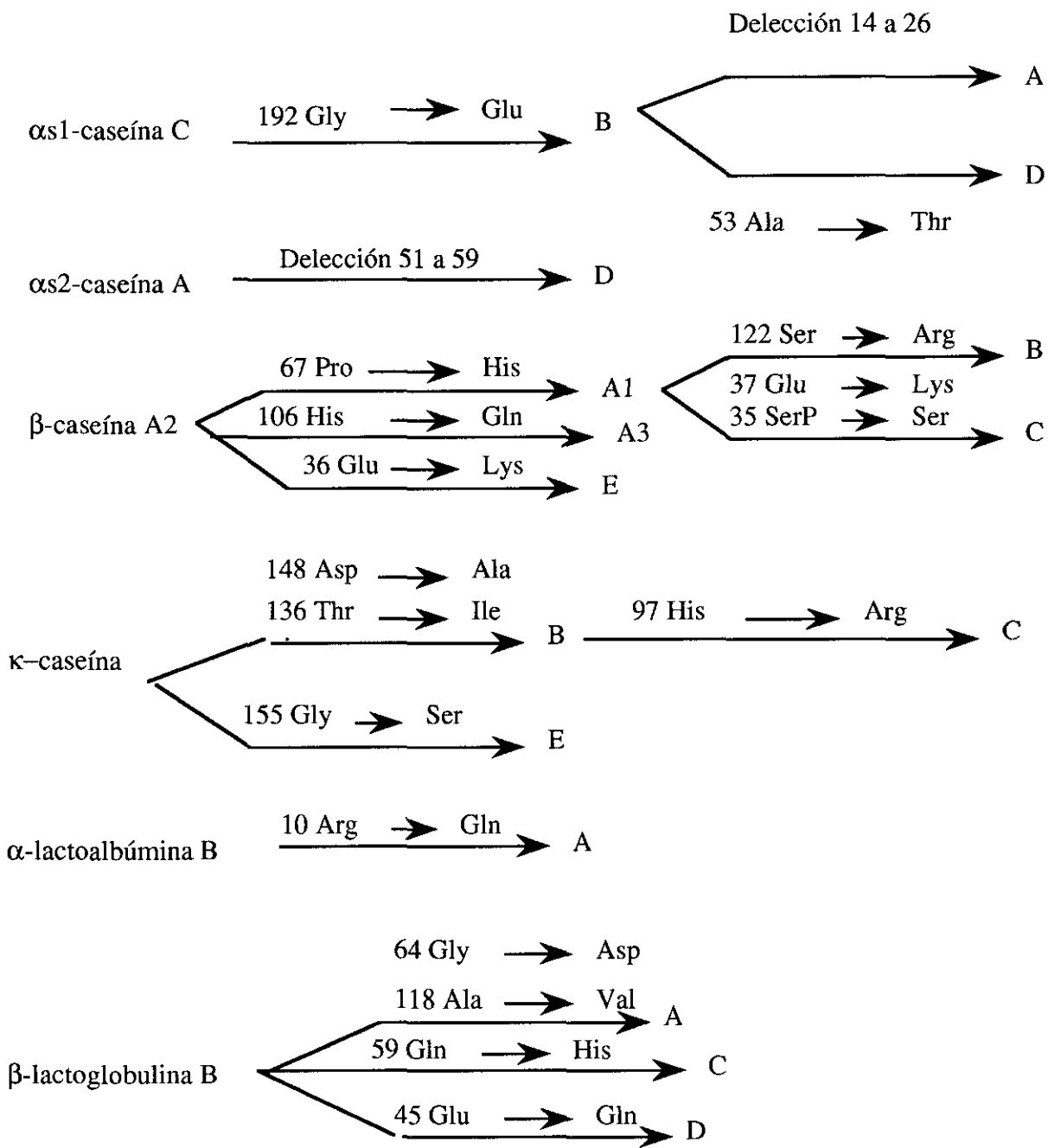
La determinación de la estructura primaria de la fracción caseínica de la leche condujo a la identificación de las distintas caseínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -), así como a la caracterización de la mayoría de sus variantes genéticas (Mercier y Vilotte, 1993). Así, se estableció que la heterogeneidad de la caseína se debía al polimorfismo genético y a las modificaciones post-traslacionales. Las modificaciones post-traslacionales de las proteínas son principalmente fosforilaciones, glicosilaciones y reacciones de proteólisis (Jennes, 1982). Estas modificaciones se realizan vía enzimática en el aparato de Golgi y determinan en gran medida la heterogeneidad de las caseínas (Martin, 1993). Las fosforilaciones son modificaciones post-traslacionales que permiten la unión de las submicelas de caseína a través de la fijación covalente de grupos fosfocálcicos. Entre estas modificaciones también se incluyen las glicosilaciones de la κ -caseína, que en gran medida determinan la estabilidad micelar.

El polimorfismo genético está causado por mutaciones que afectan a una fracción pequeña de los genes (3-7 %). Dentro de las proteínas lácteas, las distintas fracciones caseínicas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseínas) se separan por técnicas cromatográficas de intercambio iónico (HPLC y FPLC) con una resolución alta, sin embargo estas técnicas no permiten separar las diversas variantes genéticas de cada una de las caseínas (Swaigood, 1993). La detección de las variantes genéticas de las proteínas lácteas resultantes de las mutaciones se realiza tradicionalmente por técnicas electroforéticas utilizando geles de poliacrilamida que permiten separar variantes genéticas de una misma proteína que difieran en la carga o en el tamaño molecular. Sin embargo, de cada 4 mutaciones, solamente 3 originan la sustitución de un aminoácido por otro y de estas sustituciones sólo una tercera parte da lugar a una modificación de la carga neta de la proteína detectable por electroforesis (Martin, 1993).

Todas las proteínas principales de la leche de vaca (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseínas) presentan como mínimo dos variantes genéticas detectables por electroforesis, sin embargo mientras que los genes que codifican por la síntesis de la α_{s2} -caseína y de la α -lactoalbúmina no presentan generalmente polimorfismo, este fenómeno es frecuente en los genes que codifican por la α_{s1} -caseína, β -caseína, κ -caseína y β -lactoglobulina. Algunas variantes genéticas de las proteínas lácteas se expresan con mucha mayor frecuencia que otras (Swaigood, 1982). Así por ejemplo, la variante B de la α_{s1} -caseína es la predominante en todas las razas (Grosclaude, 1988).

En la tabla II.1. se muestran las características bioquímicas de las variantes genéticas de las proteínas de la leche de vaca.

Tabla II. 1. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche de vaca (1)



(1) Los números indican las posiciones de las sustituciones o deleciones en las cadenas peptídicas

Fuente: Swaisgood, 1982

La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes y el conocimiento de los fundamentos moleculares del polimorfismo genético de las caseínas ha conducido a la utilización de técnicas genéticas que permiten realizar una selección dirigida de las especies con el fin de mejorar las propiedades de las leches que se destinan a la fabricación de quesos (Martin, 1993).

II. 5. 1. 2. Estructura primaria de las caseínas

La estructura de las caseínas es similar a la de las proteínas globulares típicas, aunque existen dos características que las diferencian de estas últimas: su contenido en residuos de fosfoserina y la distribución uniforme de residuos de prolina, hecho que impide el empaquetamiento denso y ordenado de las cadenas polipeptídicas (López-Fandiño, 1990). Los residuos de fosfoserina de los dominios polares son los primeros lugares de unión del calcio o de las sales cálcicas (Holt y Hukins, 1991), y por tanto el número de residuos de fosfoserina que contiene cada molécula de caseína determina la solubilidad dependiente de la concentración del calcio. Así, para las distintas fracciones de la caseína se establece el siguiente orden de solubilidad: α_{s2} - < α_{s1} - < β - < κ -caseína. Las principales propiedades de las caseínas se resumen en la Tabla II. 2.

α_{s1} -caseína

La α_{s1} -caseína es una cadena polipeptídica constituida por 199 aminoácidos cuyo peso molecular es de 23.619 Dalton (Farrell, 1988). Se han identificado cinco variantes genéticas: A, B, C, D y E. Está formada por dos regiones predominantemente hidrofóbicas (restos 1-44 y 90-199) y por una zona polar muy cargada. La alta hidrofobicidad y la poca organización del segmento 100-199 son responsables de la asociación que experimentan las moléculas de α_{s1} -caseína en disolución acuosa. La molécula contiene 8 residuos de fosfoserina que excepto uno están en el segmento 45-89. Su contenido en residuos de prolina es elevado y están distribuidos uniformemente a lo largo de la molécula lo que da lugar a una estructura desordenada (70 %) con una pequeña proporción de estructura secundaria en α -hélice u hoja plegada β -. La ausencia de residuos de cisteína en la α_{s1} -caseína impide la formación de puentes disulfuro y por tanto de uniones cruzadas entre las cadenas proteicas. Esta caseína es muy sensible al calcio al pH normal de la leche, pudiéndose producir la floculación a cualquier temperatura (Luquet, 1991).

Tabla II.2. Propiedades de las caseínas de la leche

Caseína	Formas diferentes	Variantes genéticas	Número de aminoácidos	Masa molecular	Número de grupos fosfato
α_s -	α_{s0}		199	23.600	9
	α_{s1}	A, B, C, D			8
	α_{s2}	A, B, C, D	207	25.150	10
	α_{s3}		207	a	a
	α_{s4}		207		
	α_{s6}		207	25.390	13
β -		A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, B _Z , C, D, E	209	24.000	5
k -	k ₁ , k ₂ , k ₃ , k ₄ , k ₅ , k ₆ , k ₇	A y B	169	19.000	1
γ -	γ_1	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B,	29-209		
	γ_2	TS-A ₂ , TS-A ₃ ,	106-209	20.000	
	γ_3	S, R, TS-B	108-209	12.000	
				12.000	

Fuente: Brunner, 1981

α_{s2} -caseína

Esta caseína representa del 8-11 % del total, tiene 207 aminoácidos y de 10-13 grupos fosfato, lo que da lugar a la existencia de distintas formas moleculares, conocidas como: α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} y α_{s6} . La masa molecular varía entre 25.150 y 25.390 Dalton. La α_{s2} -caseína tiene 2 residuos de cisteína aunque a diferencia de las moléculas de la k-caseína que se asocian por puentes disulfuro formando agregados de gran tamaño, las moléculas de α_{s2} -caseína se unen formando solamente dímeros o bien se forman enlaces disulfuro intracatenarios. Esta caseína es muy sensible al calcio, cualquiera que sea la temperatura, debido a su riqueza en grupos fosfato.

β -caseína

La β -caseína es la segunda proteína más abundante de la leche. Está formada por una cadena de 209 restos aminoacídicos y tiene un peso molecular de 24.500 Dalton. Se han identificado 7 variantes genéticas. La β -

caseína tiene 5 restos de fosfoserina y carece de cisteína lo que impide la formación de puentes disulfuro y por tanto de uniones cruzadas entre las cadenas proteicas. La porción N-terminal de la molécula (restos 1-40) contiene los residuos de fosfoserina y por tanto es la parte polar, mientras que la porción C-terminal (restos 136-209) contiene la mayor parte de sus residuos apolares. Al igual que la α_{s1} -caseína, la β -caseína es insoluble a temperatura ambiente en presencia de calcio a concentraciones inferiores a las de la leche. A medida que la temperatura aumenta, se origina una mayor formación de enlaces hidrofóbicos y una mayor asociación molecular. Por consiguiente, la solubilidad de esta proteína es dependiente de la temperatura, efecto que se explica por la distribución molecular de las cargas.

k-caseína

La κ -caseína tiene 169 aminoácidos, 2 residuos de cisteína y uno de fosfoserina en la región C-terminal. Se presentan 2 variantes genéticas, A y B, que tienen una masa molar de unos 19.000 Dalton, que varía según el derivado glicosilado considerado. La k-caseína se diferencia de las otras caseínas (α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseínas) en que es soluble en un amplio intervalo de concentraciones de calcio y por ello, se le ha asignado la función de ser la responsable de la estabilidad micelar (Waugh y Von Hippel, 1956). De todas las fracciones de la caseína, es la κ -caseína el principal lugar de acción de la quimosina. Como resultado de la acción de la quimosina sobre la κ -caseína, entre los aminoácidos 105 (Phe) y 106 (Met), se forman dos productos de la hidrólisis denominados “para- κ -caseína” (fragmento N-terminal) y “macropéptido” (fragmento C-terminal), lo que origina la coagulación de la leche. Las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β se recuperan en la cuajada, junto con la paracaseína κ ; el caseinoglicopéptido soluble aparece íntegramente en el lactosuero. Las moléculas de κ -caseína se asocian por puentes disulfuro formando un polímero esférico constituido aproximadamente por 30 moléculas con un diámetro de 11 nm (Vreeman y col., 1981). Además, la κ -caseína es la única caseína que además de estar fosforilada está glicosilada. La fracción glucídica de la k-caseína se compone de 3 monosacáridos que son: el ácido N-acetilneuramínico, la galactosa y la N-acetilgalactosamina que se unen entre sí formando cadenas laterales de disacáridos y tetrasacáridos (Swaigood, 1982) asociado al macropéptido (Eigel y col., 1984).

γ -caseínas

El grupo de γ -caseínas son fragmentos resultantes de la escisión de la β -caseína por acción de la plasmina. Los fragmentos más pequeños forman parte de la fracción proteosa-peptona del suero de la leche.

II. 5. 1. 3 . Estructura secundaria y terciaria de las caseínas

El tamaño, la forma y la configuración de una proteína no sólo está determinada por su estructura primaria y su composición sino también por las fuerzas de unión electrostáticas, puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas (Whitney, 1988). La estabilidad micelar se debe en parte a las uniones hidrofóbicas que establecen las caseínas. Estas interacciones son sensibles a la temperatura siendo mínimas a temperaturas inferiores a los 5 °C y así, a medida que la temperatura disminuye, la estabilidad de las uniones hidrofóbicas es menor y las caseínas se disocian de la micela. Con el descenso de la temperatura, las fracciones α_{s1} - y α_{s2} -caseínas difunden de la micela en una proporción muy inferior a la del resto de las caseínas. Asimismo se ha demostrado, que los enlaces iónicos intervienen en la estabilidad de la estructura de la micela (Pepper y col., 1970).

Las caseínas no son cristalizables y por tanto no es posible la observación directa de su estructura por cristalografía de rayos x. Para determinar las regiones dotadas de estructura secundaria se han establecido métodos predictivos que están basados en su estructura primaria (Swaigood, 1993). Los resultados obtenidos con estos estudios han confirmado que aunque la estructura de las caseínas sea menos ordenada y más flexible que la de las proteínas globulares del suero, existen partes dotadas de estructura secundaria y probablemente de estructura terciaria (Swaigood, 1993). Así por ejemplo, se ha concluido que la β -caseína contiene un 10 % de estructura α -hélice, un 13 % de estructura lámina- β y el 77 % restante de estructura desordenada (Swaigood, 1982). La k-caseína contiene más estructura secundaria y por tanto es más estable que el resto de las caseínas, siendo menos susceptible a la proteólisis que la α_{s1} - y la β -caseína.

También se han realizado estudios predictivos para determinar la estructura terciaria de las caseínas (Kumosinski y col., 1991a,b) que sugieren que la interacción de las estructuras secundarias abiertas a través de sus grupos hidrofóbicos conduciría a la formación de las submicelas (Swaigood, 1993).

II. 5. 1. 4. Estructura de la micela de caseína

Las caseínas se presentan en la leche de forma micelar, un complejo orgánico de caseínas α_s , β y κ unidas al fosfato cálcico coloidal, que se encuentra en suspensión estable gracias a la presencia de cargas negativas y de grupos glucídicos hidrófilos.

Se han propuesto diversos modelos experimentales para explicar la estructura de la micela aunque el modelo submicelar es el más aceptado. Morr

(1967), propuso un modelo micelar a partir de la formación de submicelas de 30 nm de diámetro. Estas submicelas están integradas por monómeros de α_{s1} -, β - y κ -caseína con la misma estructura que Waugh (1971), había desarrollado para la micela. Las submicelas se unen entre sí por enlaces hidrófobos y por puentes de caseinato cálcico y se agregan en la estructura micelar por el fosfato cálcico coloidal (Figura II.1.).

Slattery y Evard (1973) propusieron un modelo en el que la reacción de las caseínas origina la formación de submicelas cuya composición es variable en función de su contenido en caseína (Figura II. 2.). Así en las submicelas pobres en κ -caseína (grandes) esta proteína se localiza predominantemente en la superficie micelar donde contribuye a su estabilidad y en las submicelas ricas en κ -caseína (pequeñas) se localiza en la micela internamente. Carroll y Farrell (1983), confirmaron los resultados de Slattery y Evard, utilizando anticuerpos obtenidos frente a la κ -caseína marcados con ferritina y un microscopio electrónico. Estos autores determinaron que la localización de la κ -caseína está relacionada con el tamaño de la micela. Así, las micelas donde la κ -caseína está localizada en la superficie tenían diámetros de 142 nm mientras que en aquellas micelas que tenían diámetros de 92 nm, la κ -caseína se distribuía más uniformemente.

Según el modelo propuesto por Schmidt (1982), (Figura II. 3.), la micela está constituida por subunidades micelares de 15-20 nm de diámetro, que contienen 10 moléculas de los cuatro tipos de caseínas en proporciones variables, con presencia de Ca^{2+} en cada grupo fosfato. Las submicelas, de unos 250.000 Dalton de masa molecular, se unen por moléculas de fosfato cálcico coloidal, dando lugar a la micela. La mayor parte de la caseína κ de las submicelas está localizada hacia el exterior, es decir hacia la fase acuosa. En el interior de la micela se encuentran subunidades muy empobrecidas en caseína κ . Las caseínas más fosforiladas (α_{s2} , α_{s1} y β) son inestables en presencia de iones Ca^{2+} a las concentraciones que se encuentran en la leche. La caseína κ es hidrófila y estable en presencia de iones Ca^{2+} , características que explican que la micela se encuentre en una solución coloidal estable. Si se destruye la integridad de la caseína κ , las micelas pierden la estabilidad en presencia de iones Ca^{2+} , por lo que se agregan aprisionando la fase acuosa, fenómeno propio de la coagulación de la leche. Los factores que influyen en la estabilidad de la micela de caseína son: la composición salina, el descenso de pH, los tratamientos térmicos y la deshidratación, factores que intervienen de forma decisiva en el proceso de elaboración de queso. Este modelo de estructura micelar ofrece una respuesta satisfactoria a las diferencias de tamaño de las micelas, así como a las relaciones entre dimensiones de las micelas, carga mineral y riqueza de caseína κ .

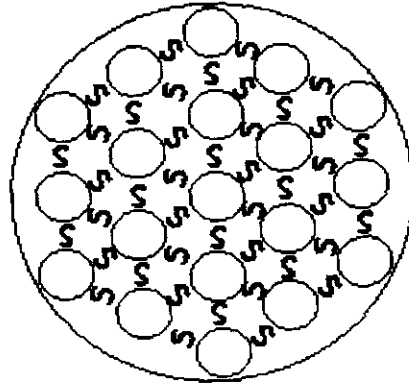


Figura II. 1. Estructura de la micela según el modelo propuesto por Morr (1967). Las líneas en forma de S representan las uniones de fosfato cálcico que se establecen entre submicelas esféricas integradas por monómeros de α_{s1} -, β - y κ -caseína.

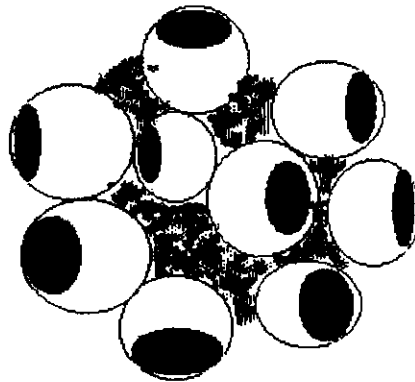


Figura II. 2. Estructura de la micela según el modelo propuesto por Slattery y Evard (1973). La micela se compone de un número aproximado de 40 submicelas. Las porciones más claras de las submicelas representan las α_{s1} - y β -caseínas mientras que las porciones más oscuras representan las moléculas de κ -caseína. Las submicelas interiores tienen una estructura similar.

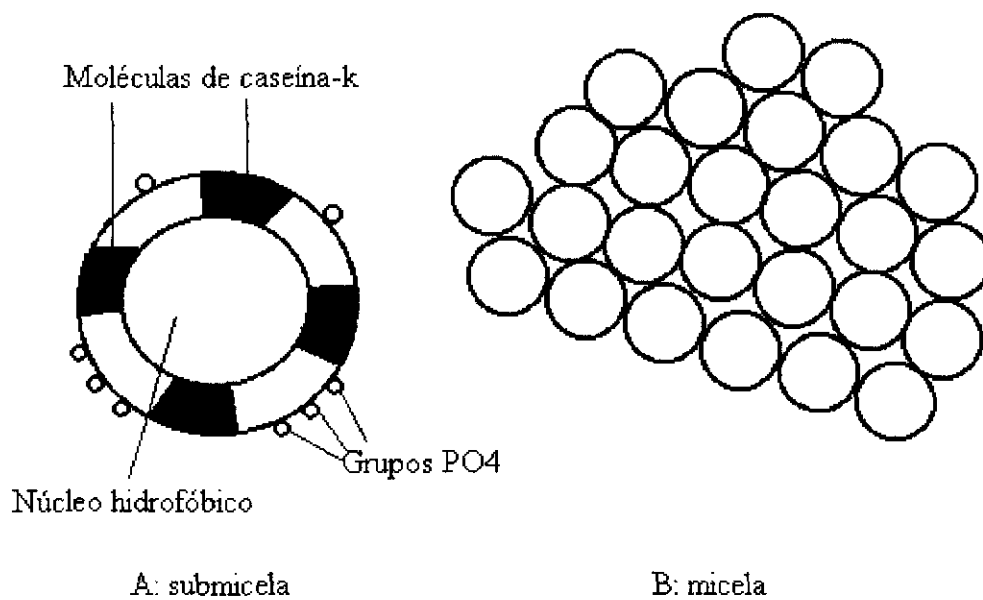


Figura Il. 3. Estructura de la micela según el modelo propuesto por Schmidt (1982). La micela de caseína está formada por subunidades esféricas de naturaleza proteica y de composición variable, asociadas entre sí mediante elementos minerales. Las submicelas poseen un interior de naturaleza hidrofóbica, debido a las porciones apolares de las caseínas y una cubierta polar debida de una parte a los residuos de fosfoserina de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β , y de otra, a la cadena COOH terminal de la caseína κ .

II. 5. 1. 5. Diferencias de composición entre las caseínas de las leches de vaca, oveja y cabra

Existen diferencias interespecíficas en la composición de la leche que reflejan los diferentes procesos metabólicos de las distintas hembras domésticas y las necesidades nutritivas de los lactantes (Jenness y Sloan, 1970).

La composición media de la leche de las principales hembras domésticas (Tabla II.3.) demuestra que el contenido de proteína de la leche de oveja es significativamente superior (5,4 %) al de las leches de vaca (3,4 %) y cabra (3,5 %). La fracción caseínica es la que se incrementa de forma significativa en la leche de oveja con respecto a las de vaca y cabra. Las diferencias de la fracción caseínica de las leches de distintas especies determinan el tiempo de coagulación por acción enzimática y la firmeza del coágulo en la fabricación del queso. Así, la leche de oveja coagula 1,56 veces antes que la leche de vaca y la firmeza del coágulo es 2 veces mayor (Amigo, 1989).

Tabla II. 3. Composición media de la leche de las principales hembras domésticas

Composición (g/100g)	Especies			
	Humana	Vaca	Cabra	Oveja
Agua	87,1	87,3	86,7	82
Grasa	4,5	3,9	4,5	7,2
Caseína	0,4	2,6	2,6	3,9
Proteína sérica	0,5	0,6	0,6	0,7
Lactosa	7,1	4,6	4,3	4,8
Minerales	0,2	0,7	0,8	0,9
Energía (Kcal/100g)	72	66	70	102

Fuente: Jenness y Sloan, 1970

Casi todas las proteínas de las leches de distintas especies han evolucionado a partir de un ancestro común, por tanto son homólogas a las proteínas de la leche de vaca y se denominan de la misma forma. El criterio definitivo para determinar la homología de las proteínas se basa en el estudio de la secuencia aminoacídica (Jenness, 1982). Los genes que codifican por la síntesis de las caseínas sensibles al calcio (α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseína) presentan una organización muy similar (Martin, 1993). Por consiguiente, la hipótesis de un origen filogenético común de las caseínas deducida a partir de la comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas (Garvey y col., 1977), queda

reforzada por el análisis detallado de las secuencias nucleotídicas de los genes. La homología de las proteínas lácteas, también se demuestra por la existencia de *determinantes antigénicos comunes que dan lugar al desarrollo de reacciones inmunológicas cruzadas cuando se utilizan anticuerpos policlonales producidos frente a la proteína de una determinada especie animal* (Amigo, 1989).

La distribución de las caseínas en las leches de vaca, cabra y oveja se muestra en la tabla II.4. La proteína mayoritaria de la caseína de la leche de vaca es la fracción α_{s1} -. Las distintas caseínas de la leche de vaca se distribuyen cuantitativamente en el siguiente orden: α_{s1} -: 38 %, α_{s2} -: 10 %, β -: 36 % y κ -: 13 % (Davies y Law, 1980).

La leche de cabra contiene una menor proporción de α_s -caseína que la leche de vaca y secuencialmente está más relacionada con la α_{s2} -caseína de la leche de vaca que con la α_{s1} -caseína. La leche de cabra incluso a una concentración de caseína igual a la de la leche de vaca, da geles caseínicos de fuerza inferior durante el proceso de elaboración del queso, hecho que demuestra la relación existente entre el contenido en α_s -caseínas de la leche y la dureza del gel. No obstante, las proporciones de α_{s1} y α_{s2} caseína en la leche de cabra varían de forma significativa en los animales considerados individualmente. Las leches de cabra que contienen una cantidad elevada de α_{s1} -caseína se han asociado con quesos que presentan un sabor y olor menos intensos y una textura más firme y lisa (Heil y Dumont, 1993).

La α_s -caseína de la leche de oveja difiere marcadamente de la leche de cabra. Se han aislado e identificado tres de sus componentes designados como α_{s1} -, α_{s2} - y α_{s3} -, siendo la fracción α_{s1} - la que se encuentra en menor proporción. El porcentaje de caseínas α_{s1} y α_{s2} es más elevado en la leche de oveja que en la leche de cabra (30,2 % respecto a un 12,6 %), aunque es significativamente más bajo que en la leche de vaca (45,5 %). Este hecho puede explicar la ausencia de sabores amargos en quesos madurados con leches de oveja y cabra, ya que las α_s -caseínas son más susceptibles que la β - a la proteólisis del cuajo. Cuando la α_s -caseína se hidroliza durante la maduración del queso, los péptidos resultantes aportan un aroma característico dependiendo del aminoácido terminal, así por ejemplo cuando la fenilalanina está en posición terminal confiere al queso un sabor amargo.

La β -caseína de las leches de oveja y cabra tienen una composición aminoacídica muy similar a la de la β -caseína de vaca aunque presentan algunas diferencias en su estructura primaria. La β -caseína de cabra y oveja tiene 2 componentes, β_1 y β_2 , que difieren en el contenido de fosfato. La leche de cabra presenta un contenido de β -caseínas notablemente superior al de las

Tabla II. 4. Fracciones caseínicas de la caseína total de las leches de vaca, oveja y cabra

Fracción caseínica	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de oveja
α_{s1}	36		15,5
α_{s2}	9,5	12,6	14,7
β_1	33	35,9	18,9
β_2		39,4	28,2
κ	9,4	8,1	7,3
γ	6,8	3,9	15,4

Fuente: Assenat, 1985

de vaca y oveja, mientras que la de vaca es la que tiene menor proporción de estas caseínas. La leche de oveja también tiene un contenido de β -caseína muy superior al de la leche de vaca (Law y col., 1992). Dado que la β -caseína tiene tendencia a disociarse de la micela con la disminución de la temperatura, una mayor proporción de esta caseína puede determinar la existencia de variaciones en la estabilidad micelar y repercutir en el proceso de fabricación del queso.

La secuencia de la para- κ -caseína en las leches de vaca, oveja y cabra es muy similar mientras que las diferencias de secuencia del caseinomacropéptido en las tres especies son mucho mayores. El tiempo de coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso es más sensible a las variaciones de contenido en κ -caseína que a los de α_s o β -caseína. Algunos autores (Law y Tziboula, 1992), han determinado que el contenido de κ -caseína es mayor en la leche de cabra que en las de vaca y oveja, aunque existen variaciones dependiendo de las variantes genéticas y del ciclo de lactación.

II. 5. 1. 6. Proteínas séricas de la leche

Las proteínas séricas de la leche son aquellas que permanecen en el lactosuero después de la precipitación de las caseínas por la acidificación de la leche a pH 4,6 y a 20°C (Whitney, 1988) o bien por vía enzimática. El calentamiento de la leche las desnaturaliza, provocando su floculación y el desenrollamiento de su estructura globular.

Las proteínas séricas a diferencia de las caseínas no están fosforiladas y raramente están glicosiladas. Se han realizado estudios predictivos de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas séricas de la leche a partir de sus secuencias primarias (Sawyer y Holt, 1993). Estas proteínas globulares según se ha determinado por cristalografía de rayos x contienen estructuras secundarias de α -hélice y de hoja plegada- β que confieren a estas proteínas una estructura más compacta que la conformación abierta propia de las caseínas.

Además de las proteínas mayoritarias del suero (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulinas) existen varios péptidos (componente 5, componente 8 rápido y componente 8 lento) resultantes de la proteólisis de la β -caseína que constituyen la fracción proteosa-peptona.

β -lactoglobulina

Esta es la proteína mayoritaria del suero de la leche (50 %) cuyo peso molecular es de 18.360 Dalton. Se ha determinado su secuencia aminoacídica y su estructura por cristalografía de rayos x. Cuando los valores de pH de la leche se encuentran comprendidos entre 3,5 y 7,5, se presenta como un dímero con un peso molecular de 36.720 Dalton. A temperaturas reducidas cuando los valores de pH están entre 3,7 y 5,1, los dímeros de la β -lactoglobulina forman octámeros. La β -lactoglobulina tiene estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria bien definidas y susceptibles de ser desnaturalizadas por efecto del calor, del pH (valores superiores a 8,6) y de las altas concentraciones de calcio. Existe un grupo sulfidriilo libre por cada molécula. Este grupo tiol permite la interacción de esta proteína con la κ -caseína durante el calentamiento de la leche (Euber y Brunner, 1982).

α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina representa el 25 % de las proteínas del suero y un 4 % del total de las proteínas lácteas. Se ha determinado su secuencia aminoacídica y su estructura es mucho más estable que la de la β -lactoglobulina. Esta proteína carece de grupos sulfidrilos libres y tiene 4 puentes disulfuro. Esta molécula tiene un peso molecular de 14.174 Dalton. Su estructura es muy similar a la lisozima. La gran proporción de estructura secundaria que existe en esta proteína determina su forma compacta.

Su función biológica es esencial ya que la α -lactoalbúmina (proteína B) interviene en la síntesis de la lactosa al modificar la actividad de la galactosil-transferasa (proteína A), constituyendo el enzima lactosa-sintetasa que hace que la UDP-galactosa se una a la glucosa para dar la lactosa.

La α -lactoalbúmina es una metaloproteína ya que contiene un átomo de Ca por molécula. Esta proteína se desnaturaliza por efecto del pH ácido y por la eliminación del calcio.

Seroalbúmina

La seroalbúmina se encuentra en la leche en bajas concentraciones (representa aproximadamente un 1,2 % del contenido total de proteínas lácteas). Su peso molecular es de 66.267 Dalton y está formada por una cadena polipeptídica de 582 aminoácidos.

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas presentes en la leche son idénticas a las del suero. Todas las inmunoglobulinas son glicoproteínas que aparecen como monómeros o polímeros de una molécula integrada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos ligeras (~ 20.000 Dalton) y dos pesadas (50.000-70.000 Dalton) unidas por puentes disulfuro (Galley, 1973).

En cada molécula de inmunoglobulina las dos cadenas pesadas son idénticas y tienen una región constante que contiene de 310 a 500 aminoácidos y una región variable que contiene de 107 a 115 aminoácidos. Las cadenas ligeras de la molécula también son idénticas y constan de dos regiones: constante y variable de igual longitud (107 a 115 aminoácidos). La región variable (N-terminal) de las cadenas ligeras y pesadas interviene en la unión de las moléculas antigénicas mientras que la fijación del Complemento, el transporte de membrana y los determinantes antigénicos específicos de especie y de clase están asociados con la región constante (C-terminal) de las cadenas pesadas (Butler, 1974).

Las inmunoglobulinas (Ig) que pueden encontrarse en la leche son: Ig G₁, Ig G_{2a}, Ig G_{2b}, Ig M, Ig A e Ig E. La Ig G₁ es la inmunoglobulina mayoritaria de las secreciones lácteas (Guidry y col. 1980). En el caso de la vaca, estos anticuerpos son muy importantes, pues la placenta es impermeable a las inmunoglobulinas, por lo que el ternero nace sin Ig G, Ig A o Ig M.

Cada clase de inmunoglobulina tiene una cadena pesada específica: γ para la Ig G, μ para la Ig M y α para la Ig A. Existen otras diferencias estructurales entre las inmunoglobulinas de distinta clase o subclase que residen en la región constante y que incluyen variaciones en: la fracción glucídica unida covalentemente, el peso molecular, el contenido de cisteína y la unión de otras cadenas polipeptídicas. También existen distintos tipos de cadenas ligeras (κ y λ) cuyas diferencias están asociadas a la región constante.

Proteosas-peptonas

Son péptidos que provienen de la caseína β como resultado de la proteólisis por la plasmina.

Proteínas minoritarias

Transferrina

La transferrina que existe en la leche es electroforéticamente e inmunológicamente idéntica a la transferrina del suero sanguíneo. Esta proteína contiene una fracción glucídica unida covalentemente que está formada por N-acetilglucosamina, manosa, galactosa y ácido N-acetilneuramínico. Por cada mol de transferrina se unen dos moles de Fe^{3+} .

Lactoferrina

Es otra proteína quelante de Fe que puede presentarse en dos formas: libre de hierro o unida a un contenido de hierro del 0,12 %. La composición aminoacídica y glucídica de esta proteína difiere significativamente de la transferrina del suero sanguíneo.

β_2 -Microglobulina

Esta molécula tiene 98 aminoácidos con un peso molecular de 11.636 Dalton. A bajas concentraciones se presenta en forma monomérica aunque a concentraciones más altas, las moléculas se asocian constituyendo un tetramero. Su estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos x.

Otras proteínas del suero

Proteínas de la membrana del glóbulo graso

La membrana que rodea a los glóbulos grasos en la leche está constituida por una mezcla de proteínas y lípidos. Parte de las proteínas son enzimas (Whitney, 1988). Según algunos autores existen dos tipos de proteínas de membrana: unas asociadas débilmente a la superficie del glóbulo graso y otras más fuertemente unidas que constituyen las proteínas de membrana propiamente dichas.

Enzimas

Existen gran cantidad de enzimas en la leche de vaca (más de 60)

asociadas a las micelas de caseína, a los glóbulos grasos, a los leucocitos o bien dispersas en el suero. Las enzimas más importantes de la leche pertenecen a los grupos de óxido-reductasas y de las hidrolasas.

Algunos enzimas son factores de degradación de los constituyentes originarios de la leche como las lipasas y proteasas que pueden inducir modificaciones tecnológicas como pérdidas de rendimientos o bien modificaciones de las características organolépticas de los productos transformados. Otros enzimas tienen una actividad antibacteriana y aportan una protección limitada a la leche, como la lactoperoxidasa y la lisozima. Algunos enzimas se utilizan como indicadores de calidad higiénica como la catalasa y las proteasas termoresistentes segregadas por algunas bacterias y leucocitos; como indicadores de tratamiento térmico como la fosfatasa y la peroxidasa debido a su termosensibilidad o bien como indicadores de especie ya que las leches de diferentes especies no contienen las mismas enzimas.

II. 5. 2. LÍPIDOS

La fracción grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos de tamaño variable (0,1-15 μm de diámetro) en función de la especie, raza y estado de lactación que están dotados de una membrana externa de proteínas y fosfolípidos (Jenness, 1988). Dicha membrana proporciona estabilidad a la emulsión ya que impide la salida de la grasa y asegura la repulsión electrostática entre los diferentes glóbulos. Los principales componentes de la membrana representan un 2 % del glóbulo graso, de los cuales el 0,9 % corresponde a las proteínas, el 0,6 % a fosfolípidos, el 0,3 % a glicéridos neutros y el 0,2 % al agua. También se encuentran componentes liposolubles como el colesterol, los ácidos grasos libres, el glicerol y una gran cantidad de enzimas.

La leche contiene alrededor de un 3,8 % de grasa, contenido variable en función de la especie y de la raza que puede oscilar entre un 2 y un 8 %. De este porcentaje, el 95-98,7 % se localiza en el glóbulo graso, un 0,4-2 % en la membrana del glóbulo graso y el 0,8-3 % en el suero de la leche. Los lípidos neutros más abundantes son los triglicéridos, encontrándose en menor proporción los monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y esteroides. Entre los lípidos complejos se encuentran los fosfolípidos, cerebrósidos y gangliósidos.

La mayor parte de la materia grasa de la leche es de naturaleza lipídica (99,5 %) y está constituida esencialmente por glicéridos. Los lípidos de la leche contienen alrededor de 200 ácidos grasos distintos. Destacan por su concentración, el ácido mirístico (C_{14}), palmítico (C_{16}), esteárico (C_{18}) y oleico

(C_{18:1}). Asimismo el contenido de ácidos grasos de cadena corta como el butírico (C₄), caproico (C₆), caprílico (C₈), cáprico (C₁₀) y láurico (C₁₂) es relativamente alto (10 %). La presencia de ácidos grasos como el ácido butírico influye directamente sobre el aroma final del queso. La leche de cabra posee cantidades mayores de ácido caproico, caprílico y cáprico que imparten al queso fabricado con ella un sabor picante característico.

La fracción insaponificable es muy variada, siendo el colesterol el compuesto más abundante (0,3 % de la materia grasa). Los hidrocarburos representan el 0,1 % de la materia grasa e incluyen el escualeno, las xantofilas y el β -caroteno (provitamina A), responsable del color amarillento de la materia grasa. Algunos de los compuestos de la fracción insaponificable son provitaminas como el 7-deshidrocolesterol que da lugar bajo la acción de los rayos UV al colecalciferol o vitamina D₃. El β -caroteno más dos moléculas de agua da lugar a dos moléculas de vitamina A. La vitamina E es un antioxidante de los lípidos que se encuentra presente en la materia grasa de la leche, así como la vitamina K.

II. 5. 3. CARBOHIDRATOS

El carbohidrato que se encuentra en mayor proporción en la leche es la lactosa (45-50 g/l en la leche de vaca). La lactosa y otros glúcidos libres se encuentran en la leche en una solución verdadera. La lactosa durante el proceso de maduración de los quesos sufre una fermentación que la transforma en ácido láctico modificando por ello el pH de la leche o la cuajada. Además, existen oligosacáridos y fracciones glucídicas que se unen a los lípidos y a las proteínas.

II. 5. 4. SALES

Las sales se encuentran disueltas en la leche o bien asociadas a las micelas de caseína. Los cationes principales que las constituyen son el sodio, el potasio, el calcio y el magnesio. Los constituyentes aniónicos son el fosfato, el citrato, el cloruro, el carbonato y el sulfato.

II. 5. 5. OTROS COMPONENTES

La concentración de oligoelementos en la leche es variable y depende del grado de contaminación de la leche después del ordeño o de la contaminación del animal por factores externos (alimentación, medio ambiente, etc). Las caseínas fijan un 95 % del Manganeso y del Zinc y un 50 y un 75 % del Hierro y Cobre. También se encuentran en cantidades traza el Iodo, Flúor, Bromo, Arsénico, Boro y Silicio.

Finalmente, existe en la leche un grupo heterogéneo de componentes que se encuentran en pequeñas cantidades (< 100 mg/l) que incluyen: gases, alcoholes, la fracción nitrogenada no proteica, nucleótidos, ácidos nucleicos, hormonas, vitaminas, enzimas y otros.

II. 6. MODIFICACIONES DE LAS CASEÍNAS POR EFECTO DEL CALENTAMIENTO DE LA LECHE

El calentamiento de la leche a temperaturas de 60°C afecta principalmente a los enlaces hidrofóbicos inter e intracatenarios de las proteínas. Por tanto, estos efectos son relevantes en las proteínas de la leche más hidrofóbicas como la β -caseína y la β -lactoglobulina (Brown, 1988).

Cuando la leche se calienta por encima de los 60°C , las proteínas séricas pierden su conformación globular y se asocian con las micelas de caseína formando puentes disulfuro y enlaces hidrofóbicos (Law y col., 1994). Así por ejemplo, las moléculas de β -lactoglobulina en leches calentadas a 100°C durante 30 minutos a pH 6,8, se unen por puentes disulfuro a las moléculas de κ -caseína de la superficie micelar.

La estructura de las micelas de caseína a medida que la temperatura aumenta (60 - 98°C), comienza a ganar flexibilidad haciendo que algunas partes sean móviles.

El enfriamiento de la leche posterior al tratamiento térmico es un método experimental empleado con frecuencia para producir la disociación micelar de la β -caseína (Brown, 1988). Las leches conservadas a 4°C pueden contener hasta un 40 % de la β -caseína disociada de las micelas. Estos cambios son reversibles, ya que en los recalentamientos las caseínas solubilizadas regresan a su localización original en la micela (Leaver y Thomson, 1993). Los cambios en la estructura micelar son reversibles si el calentamiento cesa antes de iniciarse los fenómenos de polimerización. No obstante, la mayor movilidad que experimentan las caseínas de las leches calentadas puede facilitar su unión con otras moléculas de caseína o proteínas séricas de forma irreversible (Rollema y Brinkhuis, 1989).

Cuando el tratamiento térmico (140°C) se prolonga, las caseínas interaccionan por enlaces de tipo covalente formando dímeros, trímeros y polímeros (Singh y Latham, 1993). En las leches calentadas las moléculas de β -caseína solubles pueden formar polímeros de 40 moléculas. Las moléculas de β -caseína se unen por la parte hidrófoba (C-terminal) dirigiendo la parte hidrófila (N-terminal) de las moléculas hacia el exterior.

Los tratamientos térmicos intensos también producen cambios en la secuencia aminoacídica de las caseínas que incluyen la eliminación del fosfato de los residuos de fosfoserina, la formación de la lisinoalanina y la reacción de los grupos ϵ -amino de la lisina con los grupos carbonilo de la lactosa formando los productos de las reacciones de Maillard. Las reacciones de Maillard que se desarrollan en leches sometidas a tratamientos térmicos severos entre las caseínas y la lactosa inducen la polimerización de las caseínas (Zin El-Din y Aoki Takayoshi, 1993).

Las reacciones proteolíticas de las caseínas producidas por calentamientos severos de la leche son poco significativas. Sin embargo estas reacciones de hidrólisis se desarrollan a mayor velocidad en la leche pasteurizada que en la leche cruda (Andrews, 1983), siendo la β -caseína más susceptible al desdoblamiento que la α_{s1} -caseína. La reorganización de las micelas producida por los tratamientos térmicos de la leche aumenta la accesibilidad de las caseínas a los enzimas (Leaver y Thomson, 1993), lo que explica el aumento de las reacciones proteolíticas resultantes.

El calentamiento de la leche produce la liberación del fosfato de los grupos de fosfoserina de las caseínas. Las caseínas defosforiladas pierden su capacidad de unirse al calcio aumentando la labilidad térmica de las moléculas. Las α_s -caseínas son muy susceptibles a los niveles de concentración del calcio debido a su alto grado de fosforilación y a la escasa estructura secundaria y terciaria de sus moléculas.

La acidez de la leche aumenta en 0,1 unidades de pH por cada incremento de 10°C. La disminución del pH en las leches calentadas se debe en parte a la pérdida de la capacidad tamponante de las sales y a la liberación de CO₂. Cuando la leche se calienta a temperaturas altas durante periodos prolongados de tiempo se desarrolla una acidez adicional, resultante de la producción de ácidos orgánicos y de la liberación de iones hidrógeno (proceden de la hidrólisis del fosfato caseínico y de la precipitación del fosfato cálcico). Las leches con valores de pH inferiores a 6,5, calentadas a 100°C durante 20-30 minutos coagulan formando un gel. En esas leches las proteínas séricas desnaturalizadas se unen a la superficie micelar. La unión de las proteínas séricas a la κ -caseína produce a su vez la unión de unas micelas a otras.

Los complejos formados por la unión de caseínas y proteínas séricas en leches calentadas se encuentran unidos en las micelas en el intervalo de pH de máxima estabilidad (6,6-6,7). La disociación de los complejos está impedida por fuerzas estéricas y repulsiones electrostáticas para estos valores de pH. Sin

embargo, en el intervalo de pH de mínima estabilidad (6,9-7,0) estos complejos son de menor tamaño y no están asociados a las micelas

II. 7. TRANSFORMACIONES DE LAS CASEÍNAS POR EFECTO DE LA PROTEOLISIS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO

Durante la fabricación del queso, las reacciones de degradación de las proteínas lácteas se desarrollan secuencialmente en varias etapas (Fox, 1989). En la fase previa al proceso de elaboración del queso, las proteínas de la leche se degradan por efecto de la plasmina y las enzimas microbianas. Seguidamente, se desarrollan las reacciones enzimáticas de coagulación que determinan la formación de la cuajada. Finalmente, las proteínas se degradan por efecto de reacciones enzimáticas durante la maduración del queso.

II. 7. 1. REACCIONES DE DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE

Existen diversas enzimas que intervienen en las reacciones de degradación de las proteínas de la leche previas a la elaboración del queso. La actividad de las proteasas extracelulares segregadas por bacterias psicrotrofas como las *Pseudomonas* no es significativa cuando las tasas microbianas son $< 10^6$ u.f.c./ml. Tasas microbianas de 10^7 u.f.c./ml causan reacciones de proteolisis poco importantes que afectan a la β y a la α_{s1} -caseína. Sin embargo, las enzimas termoresistentes segregadas por las bacterias psicrotrofas pueden producir rancidez y amargor durante la maduración del queso. Las proteasas segregadas por los leucocitos son menos activas que las proteasas bacterianas y actúan principalmente en las leches mamíticas. La plasmina es una proteasa endógena de la leche que interviene en la hidrólisis de la β -caseína durante la lactancia previa al ordeño, produciendo γ -caseínas y ciertos componentes de la fracción proteosa-peptona.

II. 7. 2. REACCIONES ENZIMÁTICAS DE COAGULACIÓN EN LA FORMACIÓN DE LA CUAJADA

La coagulación de la leche en la fabricación del queso se desarrolla en dos etapas. En la primera, la quimosina del cuajo hidroliza el enlace peptídico 105-106 (Phe-Met) de la κ -caseína formando la para- κ -caseína y el macropéptido, y en la segunda, la para- κ -caseína precipita por acción del Ca^{2+} a temperaturas superiores a los 20°C.

La mayor parte de la quimosina se pierde en el desuerado posterior a la coagulación de las caseínas; sin embargo parte de la enzima que queda retenida en la red proteica produce una actividad residual que tiene gran

importancia en el desarrollo de reacciones de proteólisis durante la maduración y, en consecuencia, afecta a la calidad final del queso (McSweeney y col., 1993).

II. 7. 3. REACCIONES PROTEOLÍTICAS DESARROLLADAS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO

La maduración del queso comprende una serie de reacciones bioquímicas complejas que incluyen la fermentación de la lactosa (glucólisis), la hidrólisis de la grasa (lipólisis) y la degradación de las proteínas (proteólisis). Estas reacciones de degradación dan lugar a la formación de ciertos componentes: péptidos, aminoácidos, aminas, ácidos, tioles, tioésteres, ácidos grasos, metilcetonas, lactonas, ésteres, ácidos orgánicos y alcoholes (Fox, 1989), que determinan las características organolépticas propias de cada tipo de queso (Ramos y Martínez-Castro, 1976).

Los componentes que intervienen en la maduración del queso son: el cuajo (quimosina, pepsina u otras proteasas bacterianas), las enzimas endógenas de la leche (plasmina), las enzimas de los cultivos iniciadores, las enzimas de otros cultivos bacterianos secundarios y otras enzimas de bacterias resistentes al tratamiento de pasteurización de la leche o llegadas a la leche por recontaminaciones posteriores al tratamiento térmico.

Las investigaciones realizadas por algunos autores (López-Fandiño y col., 1994) demuestran que los quesos que como el Parmesano poseen un grado de maduración mayor, contienen la mayor parte del nitrógeno total en forma soluble (nitrógeno no proteico), mientras que en otros quesos sometidos a un grado de maduración inferior como el de Mahón, el contenido de nitrógeno soluble es menor, demostrando que existe una correlación positiva entre el tiempo transcurrido en la maduración del queso y el desarrollo de las reacciones de degradación de las caseínas.

Tanto en los quesos fabricados con pura leche de oveja como en aquellos fabricados con pura leche de vaca, las reacciones de proteólisis tienen lugar principalmente durante los dos primeros meses de maduración de los quesos y en todos los casos la primera proteína que se ve afectada por dichas reacciones es la α_{s1} -caseína (Ramos y Martínez-Castro, 1976). Se ha determinado que la degradación inicial de la α_{s1} -caseína durante la maduración de los quesos es la causa principal de la modificación de la textura (ablandamiento). Por tanto, existe una correlación positiva entre los cambios de textura propios de la maduración de los quesos y la actividad enzimática de degradación de las proteínas (Farkye y Fox, 1990).

Otros autores han demostrado que cuando se empleaban diferentes tipos de cuajo comerciales con idéntica actividad coagulante en la maduración de un queso "Cheddar", el grado de proteolisis de las α_{s1} - y β -caseínas era distinto dependiendo del tipo de cuajo empleado y de la actividad residual del mismo en el queso (Farkye y Fox, 1990). Sin embargo, en todos los casos, con independencia del cuajo utilizado, la tasa de degradación de la α_{s1} -caseína era muy superior a la de la β -caseína.

Mientras que en los quesos de oveja, la β -caseína permanece relativamente estable, en los quesos fabricados con pura leche de vaca esta proteína comienza a degradarse a partir del cuarto mes de maduración del queso. De forma análoga, otros autores han demostrado que la proteolisis a lo largo de la maduración de los quesos fabricados con leche de cabra afecta menos a la β -caseína, manteniéndose intacto el 50 % de la cantidad inicial de esta proteína a los 2 meses de maduración, cuando el queso ya está listo para su consumo (Carretero y col., 1992).

La β -caseína posee muchos enlaces peptídicos que en solución son susceptibles de ser hidrolizados por la acción de la quimosina y otros cuajos. Sin embargo, en el queso no se desarrollan estas reacciones de hidrólisis debido a los enlaces hidrofóbicos que se establecen entre las distintas cadenas (Fox, 1989). Además, la presencia de NaCl inhibe la hidrólisis de la β -caseína por acción de la quimosina, aunque incluso en los quesos que no contienen sal las reacciones de degradación de la β -caseína por acción de la quimosina son poco significativas.

Dentro de las proteínas endógenas de la leche, la plasmina no interviene de forma significativa en la maduración del queso, salvo en algunas variedades pues los niveles de plasmina del queso están directamente relacionados con el pH de la cuajada en el desuerado (Johnson, 1988). A medida que disminuye el pH, la plasmina se disocia de las micelas de caseína eliminándose con el suero. La actividad de la plasmina es de 2-3 veces mayor en el queso Suizo, cuyas cuajadas presentan un valor de pH de 6,4 durante el desuerado, que en el queso Cheddar cuyas cuajadas se desueran a pH < 6,3.

Algunos experimentos realizados con quesos de tipo "Gouda" fabricados en condiciones asépticas demostraron que el cuajo era el responsable de la degradación de la α_{s1} -caseína y de la β -caseína durante el primer mes de maduración y que las enzimas bacterianas de los cultivos iniciadores contribuyen posteriormente a la degradación de las proteínas y especialmente de la β -caseína (Visser y de Groot-Mostert, 1977). Cuando se fabricaron quesos sin cuajo se concluyó que los cultivos iniciadores podían degradar parte de la α_{s1} - y β -caseínas después de varios meses de maduración siendo su

actividad proteolítica muy poco significativa durante el primer mes de maduración de los quesos.

Algunos estudios realizados indican que aunque las proteasas de los cultivos iniciadores contribuyen a la formación de péptidos de pequeño tamaño y de algunos aminoácidos, estas enzimas no intervienen en la formación de péptidos de mayor tamaño (O'Keeffe y col., 1978). Sin embargo, los estreptococos producen endopeptidasas que pueden hidrolizar las caseínas intactas, especialmente la β -caseína. Existe una proteasa de la pared celular del *Streptococcus lactis* capaz de hidrolizar 5 enlaces peptídicos situados en la región hidrofóbica de la β -caseína y ya que la quimosina del cuajo no es capaz de hidrolizar esta molécula en el queso, es muy probable que estas proteasas de los cultivos iniciadores sean las responsables de dichas reacciones de hidrólisis.

En los quesos azules donde las reacciones proteolíticas son muy intensas, los mohos que intervienen en la maduración (*Penicillium roqueforti* y *Penicillium caseicolum*) sintetizan enzimas fúngicas que son las que intervienen de forma predominante en las reacciones de degradación proteicas.

II. 8. MÉTODOS PARA IDENTIFICAR EL ORIGEN ESPECÍFICO DE LA LECHE EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS

Para garantizar la genuinidad de los quesos y evitar cualquier práctica fraudulenta que persiga la sustitución de leches de una especie por otras más baratas, es indispensable disponer de técnicas analíticas fiables que permitan detectar y cuantificar la posible adición de leches distintas de aquellas que ostenta la denominación del producto. Aunque son muchos los autores que han desarrollado técnicas sensibles y rápidas para la identificación del origen animal de una leche en mezclas lácteas y quesos, aún es preciso mejorarlas dotándolas de mayor sensibilidad, exactitud, repetibilidad, rapidez y bajo coste.

Los métodos de identificación de especies en la leche y en los productos lácteos se basan en el análisis de la composición de la grasa o de las proteínas (Ramos y Juárez, 1986). Los métodos utilizados para analizar la composición de la grasa de la leche se han basado tradicionalmente en la determinación de los índices de ácidos grasos volátiles solubles e insolubles, aunque en la actualidad se emplean sobre todo métodos cromatográficos (Ramos y Juárez, 1985). Entre los métodos basados en el análisis de las proteínas destacan las técnicas electroforéticas y las inmunológicas.

II. 8. 1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las técnicas más utilizadas en el análisis de los componentes lípidos de la leche han sido la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para comprobar la genuinidad de la grasa de la leche de una especie animal, se utilizan técnicas cromatográficas que determinan la composición de ácidos grasos, triacilglicéridos o algunas fracciones del insaponificable. La composición de los ácidos grasos que forman parte de los triacilglicéridos y las relaciones entre los mismos, se determinan utilizando la técnica de cromatografía de gases (GC). Para ello, se detectan los derivados volátiles de los ésteres metílicos que se preparan a partir de la grasa anhidra en recipientes cerrados. Las condiciones del análisis cromatográfico están normalizadas (columnas con fases polares y a valores de temperatura programados).

La grasa de la leche de vaca, oveja y cabra contiene una proporción elevada de ácidos volátiles de número par de átomos de carbono, pero las leches de cabra y oveja contienen un número mayor de los ácidos caproico (C_6), caprílico (C_8), cáprico (C_{10}) y laúrico (C_{12}). Por tanto, la detección de mezclas de leche se basa en el mayor contenido de estos ácidos grasos en las leches de oveja y cabra. Debido a la variación de los diferentes ácidos grasos atribuida a factores genéticos y ambientales, sólo es posible identificar la adición de leche de una especie animal a una mezcla a partir del 15-20 % de incorporación.

Algunos autores han determinado las relaciones de los ácidos grasos $C_4/C_6 + C_8$, C_{10}/C_8 , C_{14}/C_8 , C_{12}/C_{10} , C_{14}/C_{12} , $C_{15}/C_{14:1}$, en lugar de cuantificar ácidos grasos individuales (Benassi, 1963; Sadini, 1963; Charro y col., 1969; Kuzdzal-Savoie y Kuzdzal, 1970; Palo, 1975; Galanos y col., 1976; Ramos y col., 1977).

Gattuso y Fazio (1980), para diferenciar las leches de oveja y vaca consideran de mayor utilidad las relaciones C_8/C_6 , C_{10}/C_6 , C_{10}/C_8 , C_{16}/C_{18} y C_{16}/C_{10} . Smeyers-Verbeke y col., (1977), para detectar mezclas de vaca y cabra utilizan las variables C_{10} , C_{12} , C_4 , C_8 y $C_{14:1}$ y para detectar mezclas de oveja y cabra, emplean las variables C_4 , $C_{14:1}$, C_{16} , C_{14} y C_{10} .

Prager (1989), emplea la cromatografía de gas con una columna capilar para detectar adulteraciones en la fabricación de quesos. Para ello, extrae primero la grasa del queso y la somete a una reacción de saponificación. Seguidamente, determina los ésteres metílicos de los ácidos grasos e identifica las mezclas por los porcentajes obtenidos de los ácidos grasos y por las

relaciones de dichos porcentajes. Las columnas capilares acortan el tiempo de análisis y permiten realizar las determinaciones con mayor precisión.

Iverson y Sheppard (1989), utilizan la relación laúrico/cáprico (C_{12}/C_{10}) para detectar la incorporación de leche de vaca a las leches y quesos de oveja y cabra.

La composición de los triacilglicéridos de la grasa láctea es una determinación que puede ser utilizada para determinar el origen de la leche. Sin embargo, la grasa de la leche contiene más de 1.300 triacilglicéridos. El análisis por HPLC de los triacilglicéridos de la grasa de la leche es complejo (Barron y col., 1990), debido a que ésta contiene una gran cantidad de triacilglicéridos con un alto punto de fusión, y a que los solventes que se emplean normalmente en estas técnicas no son eficaces (Fiebig, 1985). Barron y col., (1990), detectaron por una técnica de HPLC diferencias cuantitativas en la composición de las leches de vaca, oveja y cabra. Sin embargo, este método no permite la separación de muchos triacilglicéridos y por tanto es necesario introducir mejoras en estas técnicas.

Los métodos cromatográficos presentan la ventaja, con respecto a los electroforéticos, de poder aplicarse a quesos madurados, ya que a excepción de algunos tipos de quesos, las modificaciones que experimenta la fracción grasa durante el proceso de maduración son escasas (Ramos y Juárez, 1985). Sin embargo, estos métodos carecen de utilidad cuando en las adulteraciones se emplea leche desnatada.

Aunque los principales métodos empleados para el análisis de las proteínas de la leche son los electroforéticos e inmunológicos, recientemente se han aplicado las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con columnas de intercambio aniónico, para detectar la adición de leche de vaca a las leches y quesos de oveja y cabra. Estas técnicas presentan la ventaja, con respecto a las electroforéticas, de ser más rápidas y permitir su automatización. Haasnoot y col., (1986), emplearon una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) con una columna de intercambio aniónico (Mono Q HR 5/5), para detectar adiciones fraudulentas de leche de vaca a leches y quesos de oveja y cabra. La diferencia de carga de la α_{s1} -caseína de la leche de vaca permite su separación de las caseínas de las leches de oveja y cabra, con un límite de detección del 1-2 % para las mezclas de leches de vaca y cabra, y del 2-4 % para las mezclas de leches de vaca y oveja. Este último límite de detección es superior, ya que el contenido de proteína de la leche de oveja es superior al de la leche de cabra. La aplicación de esta técnica en los quesos es limitada, ya que la α_{s1} -caseína de la leche de vaca se degrada rápidamente y

por tanto, el límite de detección dependerá del mayor o menor grado de maduración del queso.

Kaminarides y Anifantakis (1993), identificaron las leches de vaca, oveja y cabra empleando la técnica de HPLC. Esta técnica permitió demostrar que en condiciones cromatográficas similares, la elución de la α_{s1} -caseína de la leche de vaca es posterior a la de las leches de oveja y cabra. Por tanto, el porcentaje de leche de vaca añadida a otras leches puede ser calculado por la integración del área del pico correspondiente a la α_{s1} -caseína, utilizando una curva patrón preparada previamente con muestras de composición conocida.

II. 8. 2. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

Algunos autores han utilizado la electroforesis de las proteínas del suero de la leche para la identificación de especies (Pierre y Portman, 1970). Sin embargo, estas proteínas se desnaturalizan con los tratamientos térmicos y su contenido en los quesos es mínimo, al ser eliminadas en la fase del desuerado. Por consiguiente, en las técnicas electroforéticas cada vez se recurre más al análisis de las caseínas de la leche.

II. 8. 2. 1. Electroforesis de las caseínas

Aschaffenburg y Dance (1968), demostraron por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, que la α_{s1} -caseína de la leche de vaca experimentaba una mayor movilidad electroforética que la de la leche de cabra.

Assenat (1967), realizó un estudio en el queso Roquefort para identificar el origen de las leches empleadas en su elaboración, utilizando una técnica electroforética. Aunque esta técnica demostró su utilidad en la caracterización de las mezclas lácteas, su aplicación en los quesos no resultaba eficaz. Las reacciones proteolíticas que afectaban a las caseínas durante la maduración del queso, disminuían la sensibilidad del método y complicaban la interpretación de los resultados. Pierre y Portman (1970), utilizaron la electroforesis en la detección de la leche de vaca en leches y quesos de cabra. En su estudio emplearon quesos no proteolizados (hasta los 15-20 días de maduración). Cuando los quesos alcanzaron un grado de maduración importante, la degradación de las caseínas producía la aparición de nuevas bandas en los geles que empeoraban la resolución de esta técnica.

Ramos y col., (1977), emplearon una técnica electroforética en geles de poliacrilamida para detectar leche de vaca añadida a las leches y quesos de oveja. La detección de la leche de vaca en las mezclas se confirma por la

mayor migración electroforética en el gel, de la banda correspondiente a la α_{s1} -caseína de vaca. El límite de detección de la leche de vaca añadida a la leche de oveja es del 5 %. La detección y cuantificación de la leche de vaca en los quesos de oveja se efectúa por un péptido resultante de la degradación de la α_{s1} -caseína. Este péptido permite detectar un límite del 10 % de leche de vaca añadida a los quesos de oveja, aunque la detección es más difícil a causa de los procesos de degradación de las proteínas propios de la maduración.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una de las técnicas oficiales empleadas en nuestro país para la detección de leche de vaca en mezclas lácteas de oveja y cabra, según lo establecido en el Real Decreto 1.533/91, de 18 de octubre (BOE de 30 de octubre de 1991). La técnica se basa en la mayor movilidad electroforética de la α_{s1} -caseína de la leche de vaca con respecto a las caseínas α_s - de las leches de oveja y cabra. El límite de detección es de un 2 % de leche de vaca en leches de oveja o cabra.

En general, las técnicas electroforéticas permiten la identificación y cuantificación de una leche en mezclas lácteas. Sin embargo, existen varios factores como el pH, la concentración y tipo de cuajo, la cantidad de cuajo retenido en la cuajada, la adición de cultivos iniciadores, etc., que intervienen directamente en los fenómenos de degradación proteica y que hacen difícil encontrar una aplicación de la técnica válida para todos los tipos de queso.

II. 8. 2. 2. Electroforesis de las proteínas del suero

Amigo y col., (1989), emplearon la electroforesis de las proteínas del suero para identificar el origen animal de una leche en mezclas lácteas y quesos. Para ello, se basaron en la mayor movilidad electroforética de la β -lactoglobulina de la leche de vaca con respecto a las de oveja y cabra.

La detección de la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos mediante el análisis de las proteínas séricas de la leche, es una de las técnicas electroforéticas oficiales según lo establecido en el Real Decreto 1.533/91 de 18 de octubre (BOE de 30 de octubre de 1991). Esta técnica, se basa en la mayor movilidad electroforética de la β -lactoglobulina de la leche de vaca con respecto a la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina de las leches de oveja y cabra. El límite de detección de la leche de vaca en las mezclas lácteas es del 2 % y en los quesos del 3 %. La técnica puede emplearse tanto en leches crudas como en leches pasteurizadas, ya que los estudios realizados (Amigo y col., 1989), sobre el efecto de los tratamientos térmicos, han demostrado que el calentamiento de la leche a 90°C durante 15 segundos, no afectaba a la cuantificación de la leche de vaca en las mezclas de diversas especies animales.

II. 8. 2. 3. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es una técnica de electroforesis en un gradiente de pH que permite separar componentes que solamente difieren en 0,001 unidades de pH. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran hacia los diferentes electrodos según su carga eléctrica. La proteína entra en zonas de pH más bajas y más altas de acuerdo con la relación carga neta/curva de pH, por lo que gradualmente va perdiendo su carga neta. Cuando la proteína alcanza su punto isoelectrónico (carga neta cero), cesa su migración y precipita. Por tanto, en la técnica del isoelectroenfoque la separación depende del punto isoelectrónico de la proteína y no de su carga y tamaño. Con esta técnica, se pueden diferenciar caseínas y proteínas del suero de la leche de vaca, oveja, cabra, búfala y yegua (Ramos y Juárez, 1986).

Addeo y col., (1984), describieron un método de isoelectroenfoque de las caseínas que permitía detectar un 5 % de leche de vaca añadida a quesos de oveja tipo Pecorino con 5 meses de maduración. Este método se basaba en la diferente movilidad electroforética de las para- κ -caseínas ovina y bovina.

Krause y Belitz (1985), detectaron la adición de leche de vaca a los quesos de oveja y cabra por una técnica de isoelectroenfoque de las γ_2 -caseínas. Addeo y col., (1989), introdujeron modificaciones con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica. Para ello, provocaban la formación de γ -caseínas al someter a la β -caseína del queso a la acción de la plasmina. La separación de las proteínas en el gel de electroforesis se obtenía en 3 horas. El desarrollo del isoelectroenfoque por el aparato PhastSystem permite separar las γ_2 -caseínas de las leches de vaca, cabra, oveja y búfala en 40 minutos (Moio y col., 1990). El límite de detección de la leche de vaca en mezclas lácteas es del 0,5 %. La simplicidad y rapidez de este procedimiento permite el análisis rutinario de la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos.

Recientemente, Addeo y col., (1995), con objeto de detectar la leche de vaca añadida a los quesos de oveja, introdujeron una modificación a un método de referencia de la Comunidad Europea, que consistía en un tratamiento previo de la muestra de queso con plasmina, y una separación por medio de un isoelectroenfoque de las γ_2 - y γ_3 -caseínas procedentes de las leches de vaca y oveja. Dicha modificación consistía en efectuar un inmunoblotting de los péptidos obtenidos con la hidrólisis, utilizando anticuerpos policlonales frente a la β -caseína de la leche de vaca. No obstante, esta técnica no se puede utilizar para los quesos en cuyo proceso de elaboración se incorporan proteínas séricas. Molina y col., (1996), han desarrollado una técnica que permite detectar y cuantificar leche pasteurizada o esterilizada de vaca o proteínas séricas de vaca añadidas a los quesos de

oveja, cabra o de sus mezclas a una concentración inferior al 1 %. Para ello, la muestra de queso se separa por isoelectroenfoque mediante el aparato PhastSystem y a continuación, una vez transferidas las proteínas a una membrana de nitrocelulosa se efectúa un inmunoblotting utilizando anticuerpos policlonales frente a la β -lactoglobulina de vaca.

Rispoli y col., (1991), utilizaron una técnica de isoelectroenfoque de las proteínas séricas para detectar la leche de vaca añadida a quesos de oveja tipo Roquefort. Con independencia del grado de maduración del queso, existe una banda proteica que permite detectar la presencia de la leche de vaca en los quesos de oveja.

En general puede afirmarse que al igual que otras técnicas electroforéticas, los fenómenos de degradación proteica propios de los quesos madurados dan lugar a la formación de muchas bandas en el espectro electroforético que dificultan su interpretación.

II. 8. 2. 4. Electroforesis capilar

Aunque las técnicas más utilizadas para el análisis de aminoácidos, péptidos y proteínas han sido tradicionalmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gas (GC) y la electroforesis en geles de poliacrilamida, recientemente se ha desarrollado una nueva técnica aplicable a este tipo de análisis que es la electroforesis capilar (Cancalon, 1995). Esta técnica se basa en separar moléculas con idéntico cociente carga/masa y diferentes masas someténdolas a un campo eléctrico en el interior de un tubo de silica que tiene de 50 a 150 μm de diámetro. La ventaja que presenta este método con respecto a las otras técnicas de análisis es que permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas ya que el equipo está dotado de un sistema que elimina el tampón de relleno de la columna y lo reemplaza por otro de forma automática, permitiendo analizar los diferentes componentes de una muestra sin necesidad de intervenir. Otras ventajas de este método son la rapidez del análisis, que puede efectuarse en menos de 10 minutos aunque se ha establecido un tiempo medio de 20 minutos (sólo se requieren intervalos de 3 minutos para el lavado y reequilibración de la columna entre dos análisis consecutivos) y el pequeño volumen de tampón requerido. A pesar de que inicialmente a esta técnica se le atribuía falta de sensibilidad, este problema se está subsanando en la actualidad mediante la introducción de mejoras en los sistemas de detección.

Recientemente, las técnicas de electroforesis capilar se han empleado para separar las proteínas séricas y las caseínas en leches y quesos de diferentes especies, aunque aún no se han publicado trabajos que demuestren

la aplicación de estas técnicas en la detección de leche de vaca añadida a las leches y quesos de oveja y cabra.

Cifuentes y col., (1993), emplearon una técnica de electroforesis capilar para separar las principales proteínas séricas (β -lactoglobulina A, β -lactoglobulina B, α -lactoalbúmina y BSA) en leches de vaca crudas y UHT. El tiempo necesario para la separación de las proteínas fue de 9 minutos, mientras que para separar las mismas proteínas por la técnica de HPLC se requieren aproximadamente 35 minutos (cuatro veces más). La reproducibilidad intraensayo de los tiempos de migración era $CV < 1 \%$ e interensayo $CV < 2 \%$. No obstante, la reproducibilidad del área de pico era bastante inferior ($CV = 1,9-6,5 \%$ intraensayo y $CV = 17 \%$ interensayo). La exactitud de los resultados era alta comparada con la que se obtenía con las mismas muestras empleando la técnica de HPLC. Otte y col., (1994), separaron las proteínas séricas de leche de vaca como la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulinas G en 8 minutos. Recio y col., (1995), desarrollaron un método que mejoraba la resolución de las proteínas séricas obtenida con otras técnicas de electroforesis capilar, al eliminar las interacciones de las proteínas con las paredes del tubo capilar. Kinghorn y col., (1996), desarrollaron una técnica que permite mejorar la resolución de la seroalbúmina e inmunoglobulinas.

Tanto la composición de la caseína entera como la hidrolizada por la acción de la quimosina han sido analizadas por electroforesis capilar (Kristiansen y col., 1994). Otros autores (Chen y Zang, 1992), han empleado esta técnica con objeto de detectar la adulteración de leche cruda con leche en polvo y contrastar los resultados que se habían obtenido por HPLC. Para ello, separaban las proteínas del suero y las caseínas y cuantificaban el cociente β -caseína/ α -lactoalbúmina. Jong y col., (1993), han separado las variantes genéticas de las proteínas lácteas y han desarrollado un método para detectar la adición de leche en polvo a la leche fresca y para detectar tratamientos de sobrepasteurización. Frutos y col., (1996), también han separado las variantes genéticas de la β -lactoglobulina por esta técnica.

II. 8. 3. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

La aplicación de las técnicas inmunológicas al análisis de los alimentos para la detección de constituyentes naturales, plaguicidas, microorganismos, toxinas y otros componentes de los alimentos, está adquiriendo cada día mayor auge debido a las ventajas que aportan frente a los métodos convencionales. Su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, las hacen especialmente útiles para la detección de microorganismos y otros contaminantes en los alimentos. Las técnicas inmunológicas se diferencian del resto de las técnicas analíticas,

en que la alta tecnología reside en las moléculas (anticuerpos), en lugar de en su soporte instrumental.

El empleo de las técnicas inmunológicas en el análisis de los alimentos presenta muchas ventajas con respecto a otros métodos como la cromatografía de gas, la cromatografía en capa fina, la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis. Entre las ventajas principales conviene destacar: la mínima cantidad de muestra necesaria para el ensayo, la reducción del tiempo de análisis e instrumental poco complejo.

Los métodos inmunológicos aplicados a la identificación de especies en mezclas de leches y quesos incluyen las técnicas de inmunodifusión en geles de agar, la inhibición de la hemaglutinación, la inmunoelectroforesis, las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) y el inmunodotting (Hernández y col., 1994).

II. 8. 3. 1. Inmunoprecipitación

Los primeros inmunoensayos se basaron en la observación de que los animales inmunizados con un antígeno específico producían un inmunosuero que precipitaba “in vitro” si se mezclaba, a la concentración adecuada, con el antígeno que le había inducido. Cuando los antígenos solubles se mezclan con los inmunosueros específicos, se formaban complejos moleculares de gran tamaño observables a simple vista. Basándose en las reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo, surgió la posibilidad de diferenciar las proteínas de la leche de distintas especies animales. Sin embargo, la principal dificultad de la aplicación de estas técnicas radicaba en que los sueros obtenidos frente a la leche de vaca reaccionaban, además, con las leches de oveja, cabra, búfala y mujer. Para resolver dicho problema, se recurrió a técnicas de absorción del inmunosuero con las leches frente a las que daban reacciones cruzadas. Pinto (1966), para diferenciar leches de vaca, búfala, cabra y oveja, desarrolló una técnica de precipitación en la que utilizaba un inmunosuero obtenido frente a las proteínas séricas de leche de estas especies neutralizado con las especies heterólogas.

II. 8. 3. 2. Inmunodifusión

Las técnicas de inmunodifusión se desarrollaron con posterioridad a las técnicas de precipitación. En la técnica de inmunodifusión doble, el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un agar, y en caso de correspondencia forman en su recorrido complejos antígeno-anticuerpo que se visualizan al originar bandas de precipitación. En la inmunodifusión radial el antígeno o el

anticuerpo se incorporan directamente al gel, mientras el otro se deposita en un pocillo desde el cual difunde e interacciona con el presente en el gel.

Inmunodifusión doble

Durand y col, (1974), detectaron la incorporación de leche de vaca en leche de cabra u oveja por el método de inmunodifusión en agar. Para ello, estos autores obtuvieron un inmunosuero específico anti-proteínas séricas de leche de vaca, después de neutralizarlo con proteínas de las leches de oveja y cabra. Este método es aplicable a quesos madurados, ya que los fenómenos de degradación de las proteínas no afectan a los resultados. Sin embargo, las proteínas séricas se desnaturalizan con los tratamientos térmicos, y por tanto, el método no es aplicable ni a las leches esterilizadas ni a los quesos fundidos de vaca.

García y col, (1989), desarrollaron una prueba de campo (COMIT), basada en la inmunodifusión en geles de agar para detectar la adición de leche de vaca a la leche de oveja. En esta técnica, todos los componentes de la reacción se inmovilizan en discos de papel de filtro. Por ello, esta técnica es muy útil como prueba de campo ya que todos los componentes necesarios (placas de agar, plantilla, discos de inmunosuero y de referencia) se pueden suministrar en forma de kit y la realización e interpretación de los resultados es muy sencilla. La única desventaja de esta técnica es que no es cuantitativa, por tanto, si se quieren cuantificar los resultados, o si se buscan porcentajes de adición de leche de vaca a una mezcla láctea inferiores al 3 %, hay que recurrir a otras técnicas más sensibles y precisas.

Inmunodifusión radial

Levieux (1974), desarrolló una técnica de purificación de las inmunoglobulinas Ig G₁ de la leche de vaca por cromatografía de intercambio iónico. Con las Ig G₁ purificadas se inmunizaban cabras u ovejas y el inmunosuero obtenido no presentaba reacciones cruzadas frente a leches distintas de la de vaca, eliminando la necesidad de neutralizar el inmunosuero por técnicas de absorción. Los inmunosueros obtenidos detectaban adiciones de un 1 % de leche de vaca a leches de oveja o cabra. Esta técnica presentaba la ventaja de ser rápida (3-4 horas) y sencilla.

La inmunodifusión radial es una de las técnicas oficiales para detectar leche cruda o pasteurizada de vaca añadida a leches de oveja o cabra según lo establecido en el Real Decreto 1.533/91 de 18 de octubre (BOE de 30 de Octubre de 1991). El límite de detección establecido para esta técnica es del 1 %.

II. 8. 3. 3. Inhibición de la hemaglutinación

En la técnica de inhibición de la hemaglutinación (Levieux, 1980), además de un inmunosuero específico, se utilizan glóbulos rojos de pollo sensibilizados con la inmunoglobulina Ig G₁. El inmunosuero es capaz de aglutinar estos glóbulos rojos incluso a diluciones elevadas. Al incubar una dilución del inmunosuero con una leche de cabra adulterada con vaca, los determinantes antigénicos propios de la leche de vaca neutralizan la actividad del inmunosuero y los glóbulos rojos no se aglutinan. Esta técnica tiene un límite de detección de leche de vaca en leches de oveja o cabra de 0,1 % y en quesos de 0,4 %.

II. 8. 3. 4. Inmunoelectroforesis

En esta técnica, el antígeno es sometido a una electroforesis en un gel que contiene el anticuerpo. La visualización de la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo por medio de una tinción. Para cuantificar esta reacción, se emplean patrones de concentración conocida. Radford y col., (1981), detectan concentraciones del 1-5 % de leche de vaca en leche de cabra.

II. 8. 3. 5. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)

El conocimiento de la estructura de las inmunoglobulinas y el uso de una gran variedad de marcadores (isótopos radiactivos, enzimas, partículas fluorescentes, bacteriófagos y partículas inertes), permitió la difusión de los inmunoensayos. Las sustancias marcadoras se unían a la región constante (F_c) del anticuerpo por medio de un enlace covalente sin interferir con la unión al antígeno.

Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas. Estas técnicas, emplean marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. Las técnicas de conjugación para marcar los antígenos y los anticuerpos con una enzima deben permitir mantener la actividad de la enzima y del anticuerpo o antígeno conjugados. La degradación por la enzima de su sustrato produce una reacción colorimétrica que permite cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo.

El empleo de los enzimas como sustancias marcadoras en los inmunoensayos, fue introducido por Engvall y Perlmann (1971). Las enzimas presentan ciertas ventajas con respecto a otras sustancias marcadoras, como son su disponibilidad en formas altamente purificadas, su facilidad de manejo, su estabilidad a lo largo del tiempo, su bajo coste y la facilidad de su

acoplamiento a las proteínas. Las enzimas que se utilizan con mayor frecuencia en las técnicas inmunoenzimáticas son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Los sustratos solubles que más se utilizan para la peroxidasa son: la o-fenilendiamina (OPD), la 2,2'-azino-(3-etil-benzotiazolina) sulfónico (ABTS) y la tetrametilbenzidina (TMB). El sustrato soluble más usado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenil fosfato (pNPP).

En las técnicas de ELISA, uno de los dos elementos (antígeno o anticuerpo) de la reacción inmunológica, se une por enlaces hidrofóbicos o enlaces covalentes a una fase sólida (poliestireno, polivinilo, nylon, vidrio, nitrocelulosa, sílica, poliacrilamida o agarosa). Cuando se emplea como fase sólida la agarosa o poliacrilamida, la separación entre los complejos antígeno-anticuerpo y los antígenos y anticuerpos libres, se realiza por filtración o centrifugación. El formato de fase sólida que se ha empleado con mayor frecuencia, es una placa de poliestireno de 96 pocillos. En este caso, la separación entre los complejos antígeno-anticuerpo y los antígenos y anticuerpos libres se realiza por lavados sucesivos.

Existen diversos factores que determinan cuál es el formato de ELISA idóneo para el desarrollo de una aplicación específica. Estos son: la muestra objeto del análisis (tipo y cantidad), el tiempo disponible para efectuar cada determinación, el grado de exactitud requerido o los medios materiales y humanos disponibles (infraestructura, equipos de análisis y especialización de los técnicos).

Los formatos de ELISA pueden ser competitivos cuando se utilizan cantidades limitadas de antígeno o anticuerpo, o no competitivos cuando los anticuerpos o los antígenos se incorporan en exceso (Gosling, 1990). Los formatos de ELISA más utilizados son: el ELISA indirecto, el ELISA competitivo y el ELISA sandwich.

En el ELISA indirecto (Figura II. 4.), el antígeno se adsorbe a una fase sólida, y el anticuerpo que se añade a continuación, se une al antígeno inmovilizado. El anticuerpo puede estar directamente conjugado a una enzima o bien se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima que reconoce como antígeno al anterior. Finalmente, se añade el sustrato específico de la enzima. La degradación del sustrato por la enzima produce una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría.

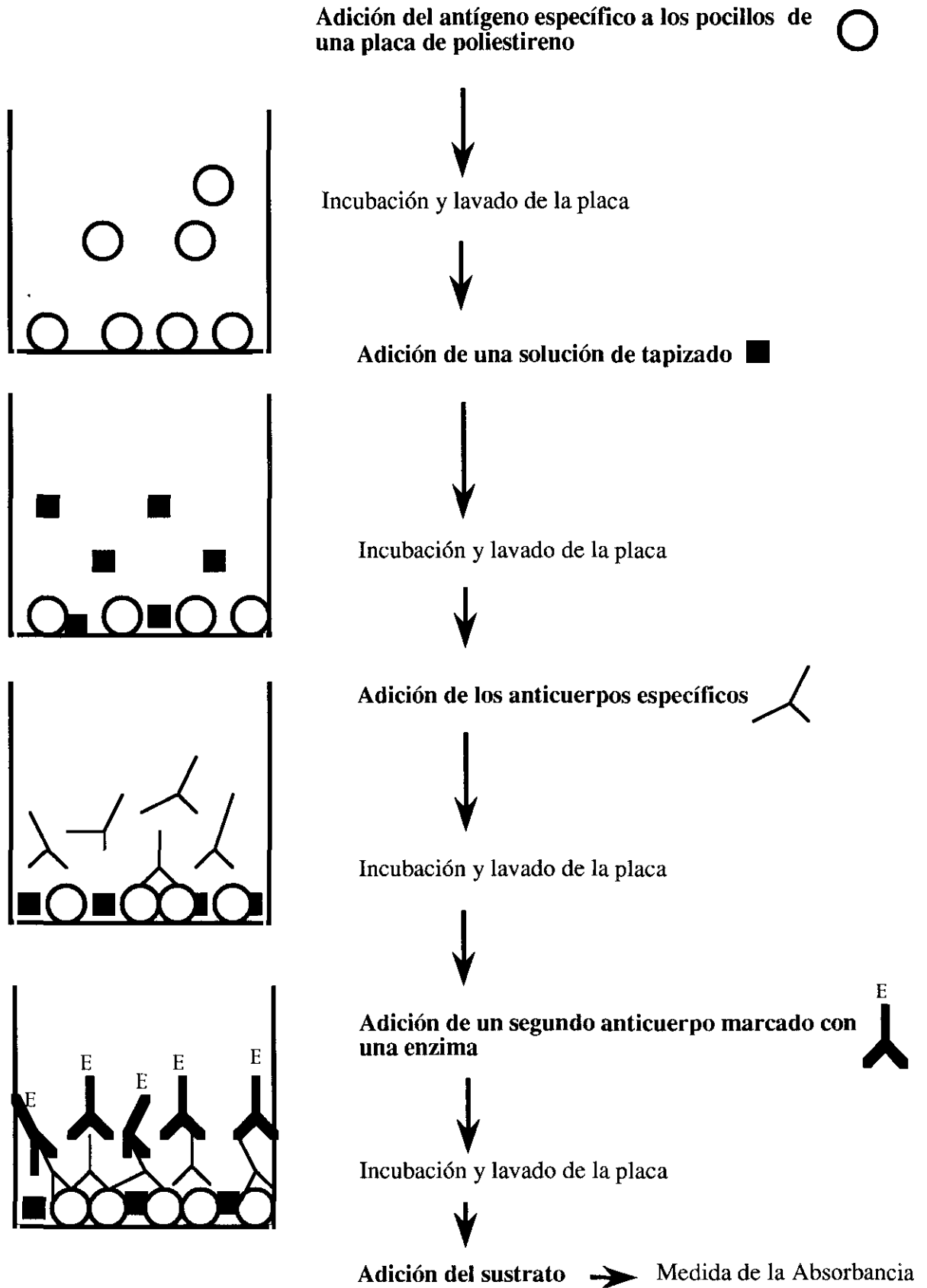


Figura II. 4. Modelo teórico de un ELISA indirecto para la detección y cuantificación de un antígeno en una muestra problema.

En el ELISA competitivo (Figura II. 5.), el antígeno purificado se adsorbe a la fase sólida. A continuación, se añaden conjuntamente una muestra que contiene una concentración desconocida de antígeno y un anticuerpo específico marcado con una enzima. Los antígenos presentes en la muestra competirán con los antígenos inmovilizados por su unión al anticuerpo. Seguidamente, se eliminan los anticuerpos unidos a los antígenos de la muestra por un lavado. La unión de los anticuerpos a los antígenos adsorbidos a la fase sólida, se mide por la reacción colorimétrica resultante de la adición del sustrato. Cuando la muestra contiene una gran concentración de antígeno, no quedan anticuerpos disponibles para reaccionar con los antígenos inmovilizados y por tanto la reacción colorimétrica es poco intensa. Mientras que cuando el antígeno no está presente en la muestra, se unen una gran cantidad de anticuerpos al antígeno inmovilizado en la fase sólida.

En el ELISA sandwich (Figura II. 6.), se une un anticuerpo a la fase sólida y seguidamente, se añade la muestra que contiene el antígeno. Después de un lavado que elimina los antígenos no unidos a la fase sólida, se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La unión del segundo anticuerpo al antígeno se cuantifica por la reacción colorimétrica resultante de la degradación por el enzima del sustrato.

En los últimos años, se han desarrollado muchos formatos de ELISA para detectar leche de vaca en leches y quesos de oveja y cabra. La técnica del inmunodotting es una técnica inmunoenzimática que utiliza como soporte una membrana de nitrocelulosa. Las muestras de leches o quesos, se depositan en la membrana y después de un período de incubación, se añade el suero específico. Seguidamente, se lava la membrana para eliminar los anticuerpos no unidos a los antígenos, y se añade un segundo anticuerpo que reconoce como antígeno al anterior. Este segundo anticuerpo está conjugado a una enzima. Cuando se añade el sustrato, éste se degrada por la enzima permitiendo la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo.

Este método es cualitativo, y está especialmente indicado como prueba rápida de campo en empresas que no disponen de la infraestructura de un laboratorio o de técnicos especializados. Aranda y col., (1988), utilizaron inmunosueros obtenidos frente a las caseínas de leche de vaca para detectar la adición de leche de vaca a leches y quesos de oveja con un límite de detección de leche de vaca en leche de oveja del 0,1 %. Estos mismos autores (Aranda y col., 1993), emplearon sueros frente a las inmunoglobulinas de la leche de cabra para detectar la adición de leches de vaca y cabra a las de oveja con un límite de detección de leches de vaca o cabra en oveja del 0,5 %.

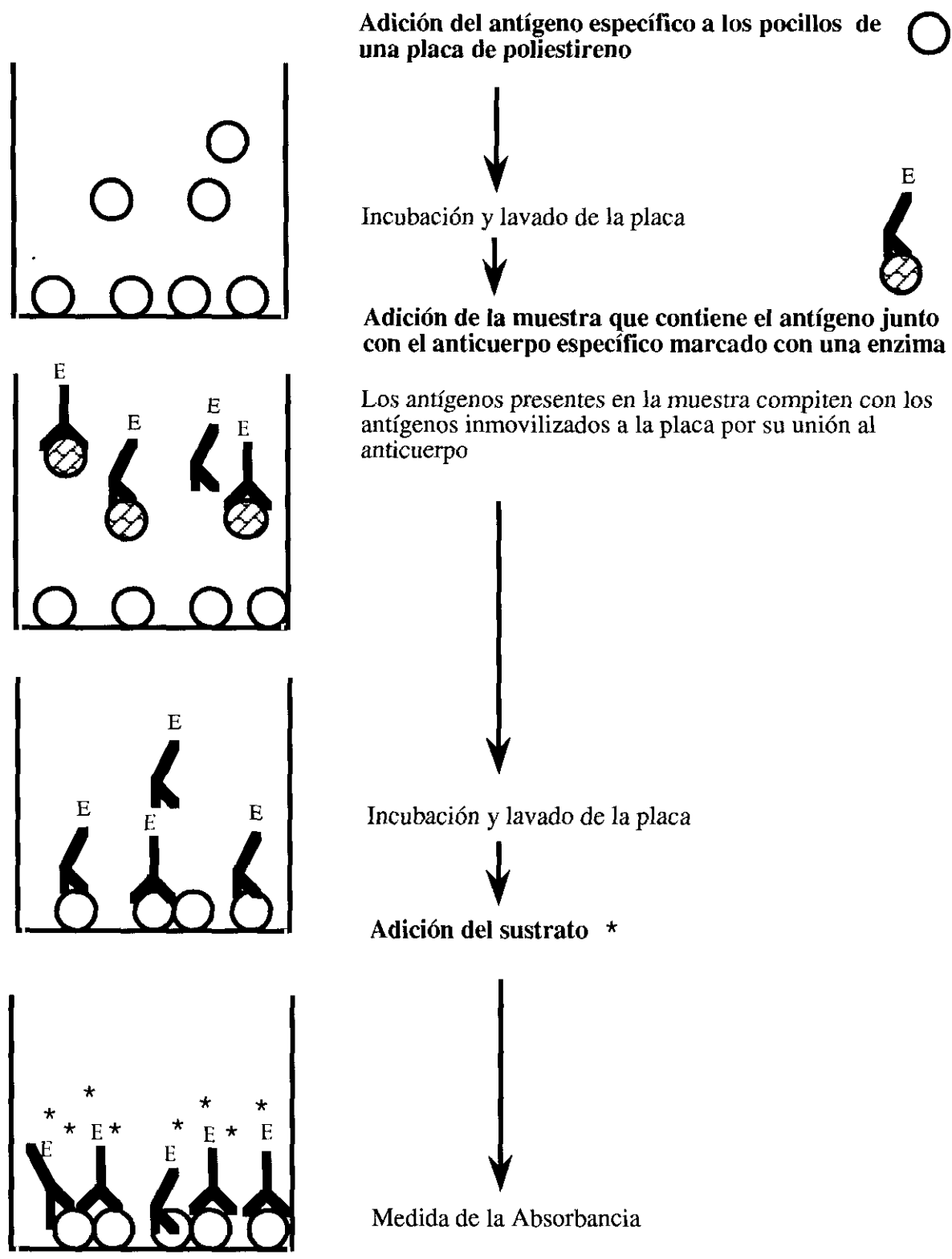


Figura II. 5. Modelo teórico de un ELISA competitivo para la detección y cuantificación de un antígeno en una muestra problema.

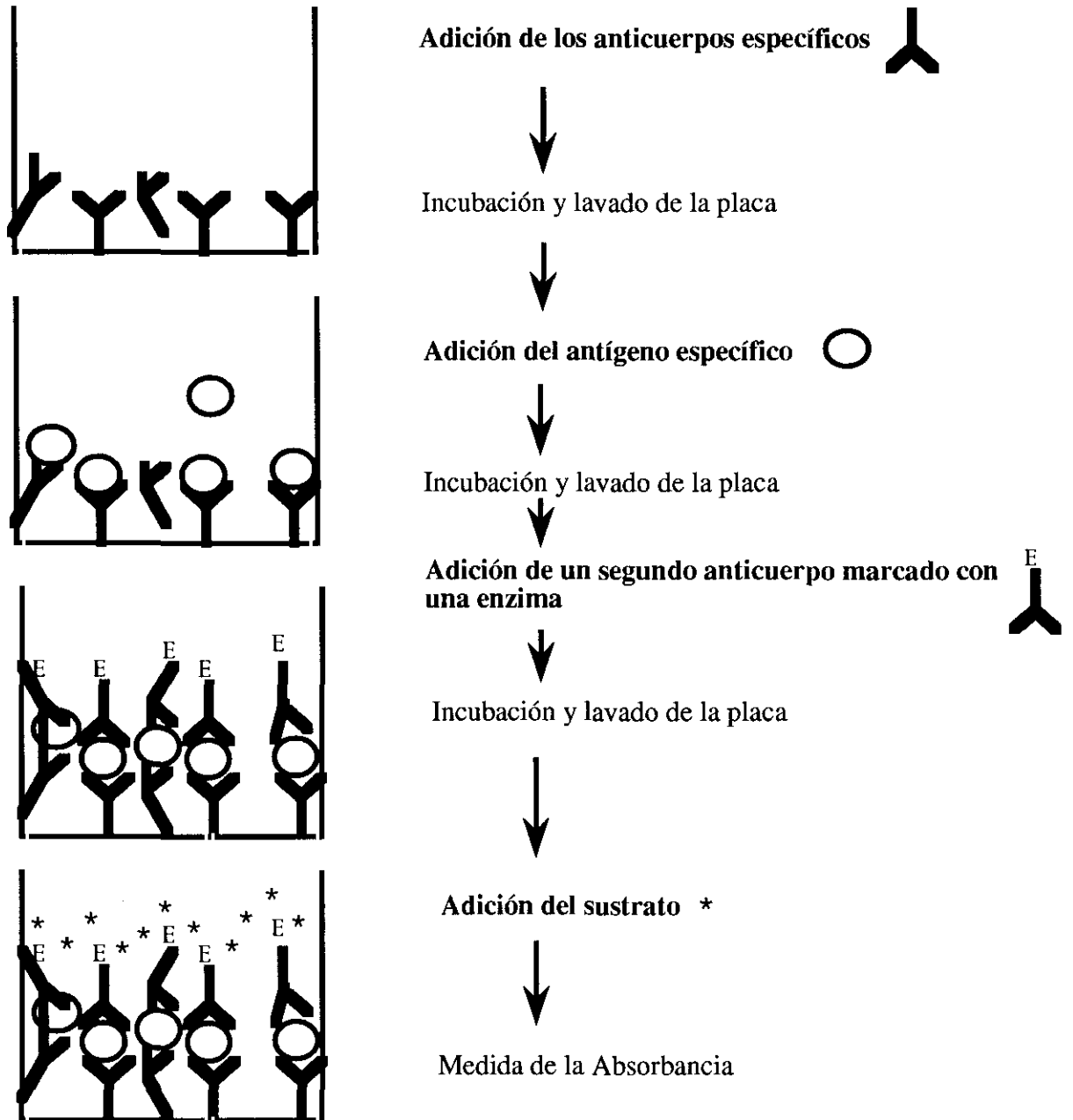


Figura II. 6. Modelo teórico de un ELISA sandwich para la detección y cuantificación de un antígeno en una muestra problema.

La mayoría de estos inmunoensayos, emplean anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas séricas (García y col., 1990; 1991), caseínas (Rodríguez y col., 1990; 1993) o péptidos de pequeño tamaño de las proteínas de leche de vaca (Rolland y col., 1993; 1995). Los anticuerpos policlonales, con frecuencia presentan reacciones cruzadas frente a proteínas distintas de aquellas que se emplearon en su obtención y por tanto, se requiere el uso de técnicas de purificación por cromatografía de afinidad o neutralización, para la eliminación de dichas reacciones inespecíficas. Además, en la obtención de los inmunoseros, los animales de experimentación se sacrifican al final de la fase de inmunización. Por consiguiente, la gran variabilidad individual en la respuesta inmunológica limita la aplicación de estas técnicas a lo largo del tiempo.

Las limitaciones inherentes a la utilización de los anticuerpos policlonales fueron resueltas por la tecnología de obtención de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975), ya que permitía la producción continua e ilimitada de anticuerpos monoclonales de especificidad idéntica a lo largo del tiempo. Levieux y Venien (1994), desarrollaron un ELISA de tipo sandwich utilizando anticuerpos monoclonales frente a la β -lactoglobulina de la leche de vaca, para detectar leche de vaca añadida a las leches de oveja y cabra. No obstante, las proteínas séricas se desnaturalizan con los tratamientos térmicos y por tanto, la mayoría de los trabajos se han dirigido a la producción de anticuerpos monoclonales frente a la κ -caseína (Feng y Cunningham, 1989; Kuzmanoff y col., 1990a), α_{s1} -caseína (Kuzmanoff y col., 1991), α_{s2} -caseína (Leung y col., 1991) y β -caseína (Nagaune y col., 1988; Kuzmanoff y col., 1991; Oudshoorn y col., 1994; Anguita y col., 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. MATERIALES

III. 1. 1. MATERIAL DE LABORATORIO

En la preparación de los tampones acuosos se empleó agua destilada desionizada obtenida en un aparato de filtración milli RO-milli Q de "Millipore". También se empleó agua destilada obtenida en un destilador "Pobel" mod. 706. (1)

Las pesadas ordinarias se efectuaron en una balanza monoplato "AND" mod. EW-600A. Para las pesadas de precisión se utilizó la balanza analítica "AND" mod. ER-120A.

Las mediciones de pH se hicieron con un pHmetro "Metrohm" mod. 654.

La disolución de los tampones se realizó por agitación electromagnética, y, en algunos casos, aplicando calor, utilizando placas "Nuova II" mod. Thermolyne. Los agitadores de tubos empleados fueron "Heidolph" mod. REAX 2000.

Las incubaciones que requerían un control preciso de la temperatura se efectuaron en un baño de agua termostatado "Selecta" mod. Unitronic 6.320.100.

La desgasificación requerida en la preparación de los tampones, se realizó mediante un aparato de ultrasonidos "Selecta" mod. Ultrasons y con una bomba de vacío "Eyela" mod. Aspirator A-3S.

Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador "Terruzi-Melvisa" mod. TP3 con una superficie útil de carga de $0,3 \text{ m}^2$, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacío y programador.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores "Liebherr" y "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator", termostatado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Las células de mieloma y los hibridomas se conservaron a -85°C en un arcón congelador "Sanyo" y a -196°C en tanques de nitrógeno líquido suministrado por "Carbueros Metálicos".

(1) *La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc., no significa que el autor las recomiende con preferencia a otras marcas del mercado.*

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada "Sorvall" mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Las centrifugaciones para pequeños volúmenes de muestra se efectuaron en una centrífuga "Heraeus" mod. Biofuge A y mod. Megafuge 1.0.

Las diálisis de las muestras se efectuaron con membranas "Serva" mod. 27/32 y "Medicell International LTD" mod. 6-27/32.

Las filtraciones de los tampones se realizaron con filtros "Millipore" mod. HATF de 0,45 μm y mod. GVWP de 0,22 μm , utilizando portafiltros "Millipore" de polipropileno.

Para las electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se utilizó un aparato de electroforesis "Bio-Rad" mod. Protean II, empleando una fuente de alimentación "Bio-Rad" mod. 200/2.0. También se realizaron electroforesis en un aparato "Pharmacia LKB" mod. PhastSystem.

Para las transferencias de los geles de electroforesis a las membranas de nitrocelulosa en la técnica de inmunoblotting, se empleó el sistema "Bio-Rad" mod. Trans-Blot, utilizando una fuente de alimentación "Bio-Rad" mod. 1000/500.

La cromatografía líquida de alta eficacia se realizó en un sistema "Pharmacia LKB" mod. FPLC provisto de una unidad control mod. LCC 500-Plus, dos bombas mod. P-500, una válvula de inyección mod. MV7, un detector mod. UV MII, un colector FRAC-100 y un registrador mod. REC 2. La columna cromatográfica utilizada fue suministrada por "Pharmacia LKB" mod. mono Q HR 5/5.

Las determinaciones espectrofotométricas, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820 y en un espectrofotómetro de doble haz "UV-VIS Hitachi" mod. U-2000.

Las placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos que se emplearon en las técnicas inmunoenzimáticas eran de "Nunc" mod. 4-42404. La agitación de las placas se hizo en agitadores de placas de ELISA "Wallac" mod. 1296-001 Delfia Plateshake y para las medidas espectrofotométricas se utilizó un lector espectrofotométrico de placas de ELISA "Flow Laboratories" mod. Titertek Multiskan Plus, versión 1.4.

Se emplearon micropipetas automáticas "Gilson" modelos p-500, p-1000, p-200 y p-20 y "Labsystems" mod. Finnpiptette. Además se utilizó una pipeta eléctrica "Tecnomara" mod. Acuboy.

Las muestras se homogeneizaron en un triturador "Polytron" mod. PTA/20TS.

La esterilización húmeda del material utilizado en este trabajo se realizó mediante un autoclave "Selecta" mod. Autester G, usando cintas de papel indicador para comprobar la efectividad del proceso. La esterilización del material de vidrio se realizó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K.

Todas las manipulaciones de los medios de cultivo celulares se efectuaron en una campana de flujo laminar "Telstar" mod. AV-100 equipada con una lámpara ultravioleta.

Las incubaciones de las células de mieloma e hibridomas se realizaron en una estufa "Heraeus" mod. 6000 a 37°C con una concentración de CO₂ del 5 %. El control del crecimiento celular y los recuentos, se realizaron con un microscopio "Nikon" mod. TMS-F Núm. 300613.

Además se ha empleado material fungible de uso general en un laboratorio de cultivos celulares como placas y frascos de cultivo celular, pipetas estériles, criotubos, tubos eppendorf, viales estériles de plástico, pipetas pasteur, etc.

III. 1. 2. MATERIAL BIOLÓGICO

III. 1. 2. 1. Origen de las muestras

En este trabajo se han utilizado dos tipos de muestras:

Muestras de leche:

1.- Leche cruda refrigerada

La leche de vaca utilizada en este trabajo procedía de la Ganadería "Priégola", de la Cooperativa "La Colmenareña" y de las Queserías "La Abulense", todas ellas ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid. En todos los casos la leche procedía de vacas de raza Frisona.

La leche de oveja fue suministrada por una ganadería ubicada en "Alcázar de San Juan" (Ciudad Real). La raza productora fue la Manchega.

La leche de cabra se obtuvo de la Quesería Artesanal "La Cabezuela", ubicada en Fresnedillas de la Oliva (Madrid). La raza productora fue la Serrana.

La leche se recogió de los tanques de refrigeración de las ganaderías correspondientes y se transportó al laboratorio en botellas de vidrio estériles, y en condiciones de refrigeración.

2.- Leches pasteurizada, esterilizada y UHT

La leche de vaca pasteurizada, esterilizada y UHT procedían de centros comerciales de venta al detalle.

Muestras de queso:

Los quesos de vaca, oveja y cabra utilizados en la preparación de las mezclas se adquirieron en centros comerciales. Se emplearon dos tipos de quesos puros de vaca: uno de nata de Cantabria y otro francés (marca "Riches Monts"), ambos con un grado de maduración de 1 mes. Como quesos puros de oveja se emplearon dos marcas: "Don Bernardo" y "Coquem" con un período de maduración de 4 meses. Como quesos de cabra se utilizaron dos tipos de quesos: un queso elaborado de forma artesanal (marca "La Cabezuela") con un grado de maduración de 1 mes y otro queso de la marca "Garrotxa" con un grado de maduración de 3 meses.

III. 1. 2. 2. Obtención de los inmunosueros

En la obtención de los inmunosueros se emplearon conejos machos blancos de raza neozeolandesa, de 2,5 Kg de peso. Los conejos se mantuvieron en el animalario del Departamento de Nutrición y Bromatología III, de la Facultad de Veterinaria (UCM) de Madrid.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales se emplearon ratones hembras de la estirpe Balb/c, de 6 semanas de edad y 20-25 g de peso, criados y mantenidos en el mismo animalario.

III. 1. 2. 3. Células de mieloma

En la obtención de los anticuerpos monoclonales se emplearon células de mieloma de ratón de la línea P3X63-Ag 8653.

III. 1. 3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo fueron suministrados por alguna de las siguientes firmas: "Panreac", "Sigma", "Merck", "Pharmacia", "Boehringer", "Probus", "Fluka", "Difco" y "Dakopatts".

Los medios de cultivo celular y los suplementos añadidos a los mismos, fueron de "Gibco", suministrados por "Izasa".

III. 2. MÉTODOS

III. 2. 1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

III. 2. 1. 1. Extracción de las caseínas de la leche de vaca

La leche cruda de vaca se desnató mediante una centrifugación a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C y se filtró por lana de vidrio. A continuación, la leche desnatada se calentó a 37°C y se acidificó con HCl 0,2 M hasta alcanzar un valor de pH de 4,6, que provocó la precipitación de las caseínas. Seguidamente, la leche se mantuvo a 40°C durante 30 minutos, y se centrifugó a 6000 g durante 30 minutos para separar las caseínas precipitadas. Finalmente, las caseínas se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar las proteínas séricas residuales. Las caseínas así obtenidas se liofilizaron y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

III. 2. 1. 2. Separación de las fracciones caseínicas de la leche de vaca mediante cromatografía líquida de alta eficacia (FPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia para la purificación de proteínas (FPLC), permite la separación de los distintos componentes de una muestra de forma rápida, reproducible, y sin pérdidas de su actividad biológica.

El equipo de FPLC está compuesto de dos bombas que impulsan los tampones a través de una columna cromatográfica. Un detector dotado con una lámpara de mercurio localizado a la salida de la columna, permite el registro de las proteínas que eluyen de la misma. Un colector recoge, de forma sincronizada a la impresión de los picos en el registrador, las proteínas que se han separado durante este proceso.

La columna cromatográfica utilizada (mono-Q HR 5/5) como intercambiador aniónico fuerte, está dotada de cargas positivas (aminas cuaternarias). Los grupos funcionales de la muestra que están cargados

negativamente, compiten con los iones salinos del tampón para unirse al lecho de la columna. Una vez que las proteínas de la muestra se han quedado unidas a la fase estacionaria, se eluyen separadamente, modificando la fuerza iónica de la fase móvil mediante un gradiente salino.

Preparación de los tampones:

Se prepararon dos tampones, denominados A y B

1.- Tampón A

Bis-tris-propano 5 mM, HCl 7 mM, Urea 3,3 M, pH 7,0

2.- Tampón B

Bis-tris-propano 5 mM, HCl 7 mM, Urea 3,3 M, NaCl 1 M, pH 7,0

En el momento de su preparación se filtraron a través de filtros de 0,45 μm .

Preparación de la muestra:

Debido a la *tendencia natural* de las caseínas a agregarse, éstas se resuspendieron en un tampón que contenía urea y β -mercaptoetanol. La urea es un agente desnaturizante de las proteínas que actúa rompiendo los puentes disulfuro que se establecen entre las cadenas proteicas, y el β -mercaptoetanol es un agente reductor que impide la reorganización de dichos enlaces.

Las caseínas liofilizadas de la leche de vaca (50 mg) se disolvieron en 10 ml del tampón A y después de agitar a 20°C durante 5 minutos, el pH se ajustó a 7,0 y se añadieron 10 μl de β -mercaptoetanol 14 mM. Seguidamente, la muestra se mantuvo en agitación durante 1 hora a 20°C, evitando su contacto con la luz para impedir la oxidación del mercaptoetanol. Finalmente, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,22 μm .

Condiciones de la separación cromatográfica:

La separación de las fracciones caseínicas de la leche de vaca se realizó siguiendo el protocolo descrito por Davies y Law (1987). El proceso comprende las etapas siguientes:

1.- Equilibrado del intercambiador aniónico

Se hicieron pasar por la columna mono-Q HR 5/5, 2,5 ml del tampón A, seguidos de 3 ml del tampón B y, a continuación, se pasaron de nuevo otros 5 ml del tampón A.

2.- Unión de las proteínas de la muestra al intercambiador aniónico

A través de la válvula de inyección se hicieron pasar por la columna 200 µl de la muestra, a un flujo de 1ml/min.

3.- Elución selectiva de las proteínas de la muestra

Una vez que la muestra penetró en la columna, el mezclador automático de tampones del aparato efectuó un gradiente salino segmentado, mezclando el tampón A con el B para que la concentración de NaCl en la columna fuera de 0,1 M cuando habían pasado 2 ml, 0,11 M con 9 ml, 0,22 M con 14 ml, 0,28 M con 21,5 ml, 0,295 con 29 ml y 0,43 M con 35 ml.

La identificación de los picos cromatográficos se efectuó haciendo pasar por la columna, las fracciones caseínicas de la leche de vaca suministradas por una casa comercial. Una vez identificadas las fracciones que se correspondían con los picos cromatográficos registrados a 280 nm, se recogieron en un colector de fracciones de 1 ml. Posteriormente, dichas fracciones se dializaron frente a agua destilada durante 48 horas y se liofilizaron.

III. 2. 1. 3. **Determinación de la proteína**

La determinación del contenido proteico de las fracciones caseínicas purificadas por FPLC se realizó según la técnica de Lowry modificada por Markwell y col., (1978). Esta técnica se basa en el desarrollo del color que se produce al reaccionar las proteínas con iones cúpricos y con el reactivo de Folín Ciocalteau, en dos etapas que se describen a continuación:

- 1.- En condiciones alcalinas, el cobre (Cu^{2+}) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de tipo Biuret), reduciéndose a Cu^+ .
- 2.- El Cu^+ , junto con la tirosina y el triptófano, reacciona con el reactivo de Folín-Ciocalteau originando un compuesto inestable que se reduce lentamente hasta dar lugar al reactivo molibdeno-túngstico de color azul. Dependiendo fundamentalmente de su contenido en tirosina y triptófano, las proteínas producen un color azul de distinta intensidad.

El método permite medir entre 10-100 $\mu\text{g/ml}$, y como en cualquier técnica colorimétrica, existen variaciones según la proteína que se mida y según las condiciones del ensayo.

Reactivos:

- 1.- Solución A: Na_2CO_3 al 2 %, NaOH al 0,4 %, dodecil sulfato sódico (SDS) al 1 % y tartrato sódico-potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)(4 H_2O) al 0,16 % en agua destilada.
- 2.- Solución B: CuSO_4 (5 H_2O) al 4 % en agua destilada.
- 3.- Solución C: Se obtuvo mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.
- 4.- Solución D: Reactivo de Folín-Ciocalteau diluido en agua destilada en la proporción 1:1 (v/v).

Procedimiento:

La determinación de proteína se realizó en dos etapas:

- 1.- Se construyó la recta patrón a partir de una batería de tubos que contenían alícuotas de 1 ml de agua destilada y de entre 10-100 μg de β -caseína. Las muestras se diluyeron en el mismo volumen (1 ml) y se preparó un blanco con agua destilada.
- 2.- Se añadieron, a cada tubo, 3 ml de la solución C, y después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a 20°C durante 10 minutos. A continuación, se adicionaron a cada tubo, 0,3 ml de la solución D, y de nuevo después de agitar, se dejaron los tubos en reposo a 20°C durante 45 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 660 nm.

III. 2. 2. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

III. 2. 2. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las fracciones caseínicas de la leche de vaca purificadas comercialmente, junto con las caseínas totales de la leche de vaca, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Esta técnica permite separar mezclas complejas de polipéptidos en

función de su tamaño molecular (Garvey y col., 1977). La electroforesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970).

El dodecil sulfato de sodio (SDS), es un detergente aniónico que interviene junto con otros agentes como el calor y el β -mercaptoetanol en la desnaturalización de las proteínas, reduciendo los puentes disulfuro de las cadenas polipeptídicas, y por consiguiente provocando la disociación de dichas cadenas en subunidades más pequeñas. El SDS, al unirse a las proteínas, las proporciona una densidad de carga similar y las dota por unidad de masa de una carga negativa neta. Al someter el complejo SDS-proteína a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido según el principio de exclusión molecular. La carga negativa neta de las partículas proteicas permite que con el impulso suministrado por el campo eléctrico, migren hacia el ánodo.

La electroforesis efectuada se denomina "electroforesis de disco" porque emplea un sistema discontinuo de tampones para elaborar el gel. Así, el gel consta de una fase superior hecha con un tampón que por su pH permite la concentración inicial de las proteínas en una zona estrecha, y una fase inferior compuesta de un tampón con distinta concentración de acrilamida y diferente pH que el primero. Esta técnica permite separar las proteínas con una resolución mayor que otras técnicas convencionales que preparan el gel con un solo tampón (sistema en continuo).

Tampones, geles y soluciones empleadas:

1.- Tampón para solubilizar las muestras

Se compone de:

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	_____	1,0 ml
Glicerol	_____	0,8 ml
SDS (10 %)	_____	1,6 ml
β -mercaptoetanol	_____	0,4 ml
Azul de bromofenol (0,05 %)	_____	0,2 ml
Agua destilada	_____	4 ml

2.- Solución de acrilamida-bisacrilamida

Contiene:

Acrilamida	_____	14,6 g
N,N'-metilen-bisacrilamida	_____	0,4 g
Agua destilada	_____ hasta	50 ml

3.- Gel de separación

Consta de:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	_____	12 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	_____	7,5 ml
SDS (10 %)	_____	0,3 ml
Agua destilada	_____	10,05 ml
Persulfato amónico PSA (10 %)	_____	0,15 ml
TEMED	_____	15 µl

4.- Gel de concentración

Está formado por:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	_____	1,3 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	_____	2,5 ml
SDS (10 %)	_____	0,1 ml
Agua destilada	_____	6,1 ml
Persulfato amónico	_____	50 µl
TEMED	_____	10 µl

5.- Tampón de electroforesis

Es un tampón Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS (0,1 %), pH 8,3.

Para preparar 2,5 l de tampón, se resuspendieron:

Tris-base	_____	7,568 g
Glicina	_____	36,03 g
SDS	_____	2,5 g
Agua destilada	_____ hasta	2,5 l

6.- Solución de tinción

Consta de:

Acido acético	_____	50	ml
Alcohol metílico	_____	200	ml
Azul brillante de Coomassie	_____	0,5	g
Agua destilada	_____	250	ml

Esta solución se filtró por papel (Whatman nº 1) antes de su utilización.

7.- Solución de lavado

Se compone de:

Acido acético	_____	200	ml
Alcohol metílico	_____	800	ml
Agua destilada	_____	1000	ml

Preparación de las muestras:

Las muestras liofilizadas (fracciones caseínicas purificadas comercialmente y caseínas totales de la leche de vaca) se disolvieron en el tampón de solubilización a una concentración de 1 mg/ml y se mantuvieron 5 minutos en un baño de agua hirviendo, antes de depositar 25 μ l (25 μ g) de cada solución en el gel de concentración.

Preparación de los geles:

El gel consta de dos fases: una fase inferior (gel de separación) y otra superior (gel de concentración). Para evitar la presencia de burbujas de aire en los geles, éstos se degasificaron por sonicación en un baño durante 15 minutos, antes de añadir el TEMED y el persulfato amónico.

El aparato para la formación de los geles se llenó primero con la solución del gel de separación hasta unos 3 cm de su extremo superior. Para evitar la formación de meniscos, se depositó en la superficie de la mezcla un pequeño volumen de una solución saturada de butanol. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 37°C, y una vez polimerizada, se retiró el butanol y se lavó su superficie con agua destilada. A continuación, se depositó la solución del gel de concentración y se introdujo el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Finalmente, la mezcla se polimerizó durante 30 minutos a 37°C, quedando el gel listo para realizar la electroforesis.

Condiciones de la separación electroforética:

La electroforesis se realizó manteniendo constante la intensidad de corriente a 18 mA en un periodo de preelectroforesis que duró 90 minutos, y cuando el azul de bromofenol incluido en el tampón de solubilización de las muestras, mostró la llegada de las proteínas al gel de separación, la intensidad se modificó, fijándola en 20 mA. Desde ese momento se dejó correr la electroforesis durante 4 horas.

Tinción del gel:

Finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de tñido, donde se mantuvo durante 90 minutos a 37°C. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

III. 2. 2. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando un PhastSystem™

Las fracciones caseínicas de la leche de vaca purificadas por FPLC, junto con las caseínas totales de la leche de vaca, se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando un aparato PhastSystem™.

El aparato de electroforesis PhastSystem™, consta de una unidad de separación y control y de una unidad de revelado para la tinción y lavado de los geles. Esta técnica permite controlar automáticamente todas las operaciones de la electroforesis dotándolas de una rapidez, reproducibilidad y capacidad de resolución altas.

Considerando que la movilidad electroforética de las proteínas es proporcional al voltaje y al tiempo aplicado, y dada la gran variabilidad que éste experimenta a lo largo del tiempo, el aparato se programa en voltios-hora. Para ello, dispone de un integrador que integra los voltios en el tiempo. Los voltios-hora son una medida de la extensión de la migración proteica en el gel.

La electroforesis se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para separaciones en geles de poliacrilamida homogéneos con dodecil sulfato sódico (protocolo número 111), de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970), y que se detalla en el apartado III.2.2.1.

Tampones, geles y soluciones empleadas:**1.- Tampón para solubilizar las muestras**

Se compone de:

Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0	_____	4,575 ml
SDS (20 %)	_____	0,75 ml
β -mercaptoetanol	_____	0,3 ml
Azul de bromofenol (0,05 %)	_____	0,375 ml

2.- Gel

El gel se obtuvo ya preparado de Pharmacia. Es un polímero homogéneo de poliacrilamida al 12,5 %, unido a un soporte transparente de poliéster.

3.- Tampón de electroforesis

Es un gel sólido de agarosa (2 %) que contiene: 0,2 M Tricine, 0,2 M Tris, 0,55 % de SDS, pH 8,1. Se obtuvo ya preparado de Pharmacia.

4.- Solución de tinción

a) Inicial:

Se disuelve 1 pastilla de azul brillante de Coomassie (R-350) en 80 ml de agua destilada y se mantiene en agitación durante 10 minutos. A continuación, se añaden 120 ml de metanol y la disolución se agita durante 3 minutos.

b) Final:

Se mezcla 1 parte de solución inicial con 1 parte de una solución de ácido acético al 20 % en agua destilada.

5.- Solución de lavado

La solución de lavado se compone de ácido acético (10 %), alcohol metílico (30 %) y agua destilada (60 %).

Preparación de las muestras:

Las fracciones caseínicas purificadas por FPLC y las caseínas totales de la leche de vaca se disolvieron en el tampón de solubilización a una

concentración de 5 mg/ml y se mantuvieron en disolución durante 60 minutos a 20°C. A continuación, se depositó automáticamente 1 µl de cada solución (5 µg de proteína) en el gel.

Condiciones de la separación electroforética:

Las condiciones que se programaron en el aparato fueron: 250 V, 10 mA, 3 W a 15°C para 1 Vh (voltiohora). Durante la aplicación de las muestras en el gel, se cambió momentáneamente la intensidad de corriente de 10 mA a 1 mA, tras lo cual se establecieron de nuevo las condiciones que se habían fijado inicialmente. La electroforesis duró 70 Vh.

Tinción del gel:

Finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de tinte, donde se mantuvo 8 minutos a 50°C. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

III. 2. 2. 3. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida con urea (UREA-PAGE)

Las fracciones caseínicas purificadas comercialmente junto con las caseínas totales de la leche de vaca, se sometieron a electroforesis nativa en un gel de poliacrilamida con urea (UREA-PAGE).

Esta técnica permite separar las proteínas de una muestra en función de su carga y de su tamaño molecular (Dunn, 1993). El tampón de electroforesis tiene un pH de 8,3, que hace que las caseínas estén cargadas negativamente permitiendo su migración al ánodo. La electroforesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Akroyd, (1968).

La urea que se incluye en el tampón para solubilizar las muestras y en el gel de electroforesis, produce una desnaturalización de las proteínas al originar una pérdida de su conformación nativa. De esta forma, se incrementa la solubilidad de las proteínas minimizando la formación de agregados que impiden su separación. A diferencia de las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), las muestras no se tratan con calor, pues la urea del tampón de solubilización forma con el calor, iones cianato que reaccionan con los grupos amino de las proteínas. Estas reacciones de carbamitación provocan modificaciones de las cargas proteicas dando lugar a electroforesis anormales.

La electroforesis realizada se denomina "electroforesis zonal", porque utiliza un gel fabricado con un solo tampón y por ello su concentración de poliacrilamida es uniforme (sistema en continuo). A pesar de que su capacidad de resolución es baja, si se compara con otras técnicas electroforéticas, las principales ventajas de este procedimiento son su rapidez y simplicidad.

Tampones, geles y soluciones empleadas:

1.- Tampón para solubilizar las muestras

Es un tampón de Urea 7 M

2.- Gel

Se compone de dos soluciones, A y B.

Solución A:

Consta de:

Tris-base	_____	18,15 g
HCl 1 N	_____	24 ml
Agua destilada	_____	26 ml

Solución B:

Se compone de:

Acrilamida	_____	15 g
N, N'-metilen-bisacrilamida	_____	0,4 g
Agua destilada	_____ hasta	50 ml

Gel:

Solución A	_____	5 ml
Solución B	_____	10 ml
Urea	_____	11,5 g
Agua destilada	_____	20 ml
Persulfato amónico	_____	5 ml
TEMED	_____	46 µl

3.- Tampón de electroforesis

Contiene:

Tris-base	_____	1,5 g
Glicina	_____	7,2 g
Agua destilada	_____	hasta 2,5 l

4.- Soluciones de tinción y lavado

Su composición es similar a la descrita en el apartado III.2.2.1.

Preparación de las muestras:

Las fracciones caseínicas comerciales junto con las caseínas totales de la leche de vaca, se disolvieron en el tampón de solubilización a una concentración de 10 mg/ml, depositándose 15 μ l (150 μ g de proteína) de cada solución junto con 2 μ l de azul de bromofenol en el gel.

Preparación del gel:

Una vez mezclados los componentes del gel, la solución se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos para disolver convenientemente la urea. A continuación, para evitar la presencia de burbujas de aire en el gel, éste se desgasificó durante 5 minutos, antes de añadir el TEMED y el persulfato amónico.

Los recipientes de formación de geles se llenaron con la solución desgasificada del gel, dejando 1 cm en su extremo superior para introducir el peine que forma los pocillos donde se depositan las muestras. El gel se mantuvo durante 1 h a 37°C para que polimerizara, tras lo cual quedó listo para realizar la electroforesis.

Condiciones de la separación electroforética:

La electroforesis se realizó manteniendo constante el voltaje a 50 V en un período de preelectroforesis, que duró 10 minutos, y seguidamente el voltaje se modificó, fijándolo en 200 V. A continuación, se dejó correr la electroforesis durante 3 horas y una vez finalizada, se extrajo el gel.

Tinción del gel:

Terminada la electroforesis, el gel se sumergió en la solución de tñido,

donde se mantuvo durante 90 minutos a 37°C. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

III. 2. 3. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales se siguió la técnica descrita por Köhler y Milstein, en 1975. Estos anticuerpos, a diferencia de los policlonales, proceden de un único clon de linfocitos B y por tanto, al ser su afinidad y especificidad idénticas, constituyen un reactivo homogéneo del que puede disponerse de forma ilimitada.

La obtención de los anticuerpos monoclonales se realizó en las etapas que se describen a continuación (Figura III.1.):

III. 2. 3. 1. Pauta de inmunización

La inmunización de los ratones Balb/c de 6 semanas de edad y de 20-25 g de peso, comenzó con la inoculación intraperitoneal del inmunógeno (100 µg de β-caseína de la leche de vaca, obtenida de acuerdo al protocolo descrito en el apartado III.2.1.2) emulsionado en una mezcla a partes iguales (0,1 ml) de Adyuvante Completo de Freund y de suero fisiológico estéril (0,85 % de NaCl p/v). Las inoculaciones se realizaron durante 2 meses a intervalos de 7 días (Tabla III.1.), sustituyendo a partir de la segunda inoculación, el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto.

Antes de la primera inoculación del antígeno y, para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente al inmunógeno utilizado, se realizó una sangría inicial (S₀). La sangre obtenida se mantuvo 1 h a 20°C para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes del tubo con la ayuda de una aguja y se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El suero obtenido se alicuotó en viales de 50 µl y se congeló a - 20°C hasta su utilización. Asimismo, a los 42 días de la primera inoculación se realizó una sangría parcial (S₁) en el plexo retroorbitario del ratón, con el fin de verificar la eficacia del proceso de inmunización.

Para comprobar la producción de anticuerpos frente a las caseínas de vaca, se utilizó la técnica del ELISA indirecto (III.2.5.1), empleando los inmunosueros resultantes de las sangrías parciales realizadas a los ratones. Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras de inmunosueros, demostraron que el título de los sueros era suficiente para proceder a la sangría final de los ratones.

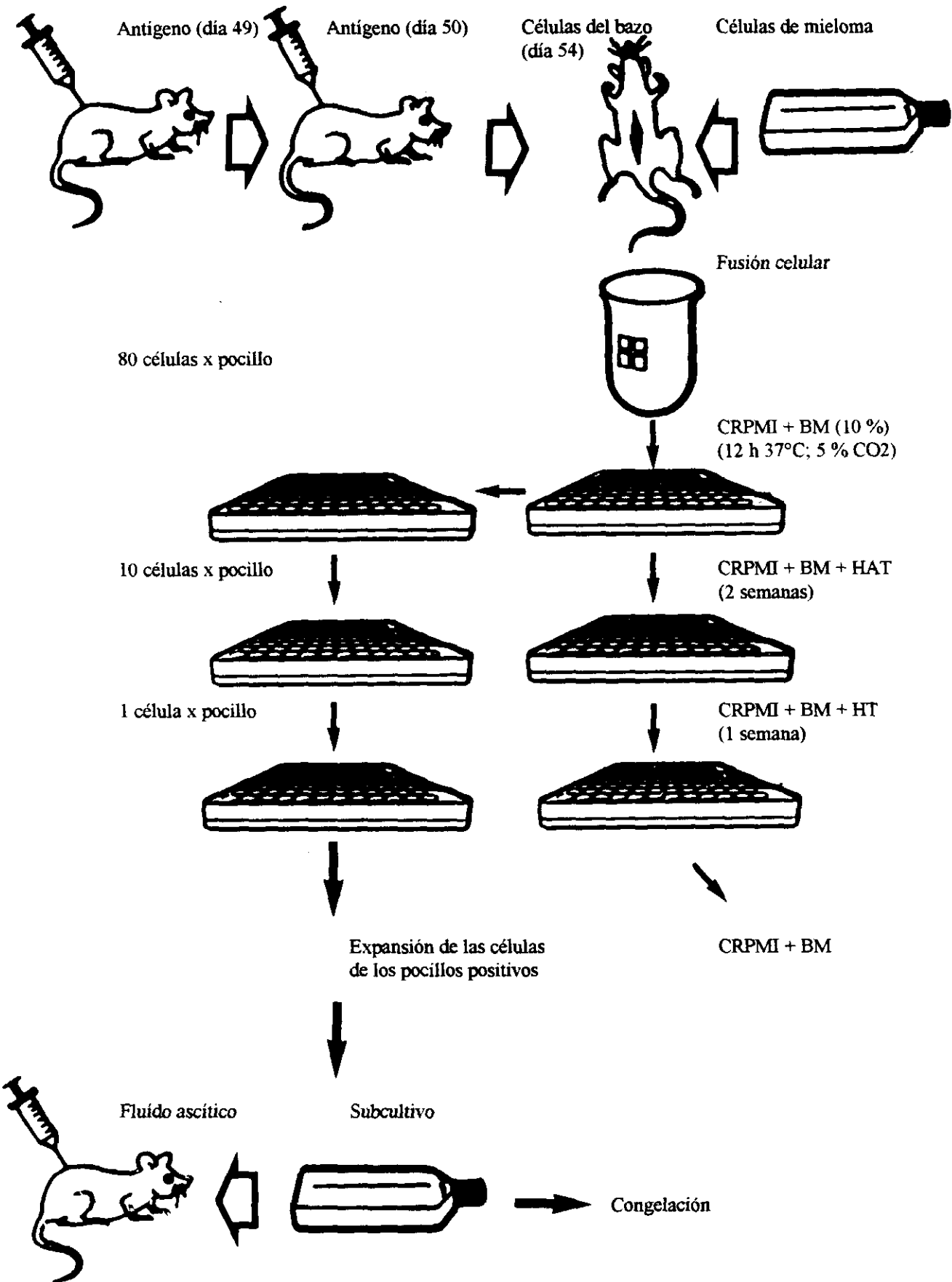


Figura III.1. Metodología empleada en la obtención de los anticuerpos monoclonales.

Tabla III.1. Pauta de inmunización de los ratones por inoculación intraperitoneal de la β -caseína de la leche de vaca

Días	β -caseína (mg)	SFE (ml)	ACF (ml)	AIF (ml)	Sangría
—	—	—	—	—	S ₀
0	0,1	0,1	0,1	—	—
7	0,1	0,1	—	0,1	—
14	0,1	0,1	—	0,1	—
21	0,1	0,1	—	0,1	—
28	0,1	0,1	—	0,1	—
35	0,1	0,1	—	0,1	—
42	0,1	0,1	—	0,1	—
45	—	—	—	—	S ₁
49 ₁	0,1	0,2	—	—	—
50 ₁	0,1	0,2	—	—	—
55	0,1	0,1	—	0,1	—
62	0,1	0,1	—	0,1	—
68	—	—	—	—	S ₂
69	0,1	0,1	—	0,1	—
71 ₂	0,1	0,2	—	—	—
74 ₂	0,1	0,2	—	—	—
81	0,1	0,1	—	0,1	—
88	0,1	0,1	—	0,1	—
95	—	—	—	—	S ₃
102 ₃	0,1	0,2	—	—	—
103 ₃	0,1	0,2	—	—	—

SFE: Suero fisiológico estéril (NaCl al 0,85 % p/v)

ACF: Adyuvante Completo de Freund

AIF: Adyuvante Incompleto de Freund

(1): Sólo ratón 1

(2): Sólo ratón 2

(3): Sólo ratón 3

S₀: Sangría inicial

S₁: Sangría día 45

S₂: Sangría día 68

S₃: Sangría día 95

III. 2. 3. 2. Fusión celular

Se basa en el mecanismo de producción de "hibridomas" descrito por Köhler y Milstein en 1975, y por el que obtuvieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. La técnica se basa en la fusión de linfocitos B, que proceden del bazo de un ratón inmunizado, con células de mieloma de ratón (células tumorales de médula ósea, que crecen indefinidamente en un medio de cultivo celular). Las células resultantes de la fusión de los linfocitos del bazo y de las células de mieloma, denominadas "hibridomas", heredan la capacidad de producir anticuerpos del linfocito, y la capacidad de sobrevivir "in vitro" del mieloma.

Para realizar la fusión celular, cuatro días después de la última inoculación del antígeno, el ratón que se había seleccionado por presentar una mayor concentración de inmunoglobulinas en el suero, se sacrificó mediante dislocación cervical. A continuación, se procedió a la extracción del bazo y éste se troceó y disgregó presionando los distintos fragmentos resultantes con un émbolo de jeringa sobre una rejilla estéril de nylon. Los linfocitos así obtenidos se resuspendieron en 10 ml de un medio de cultivo celular RPMI [RPMI-1640 + L-Glutamina (1 %) + Penicilina-Estreptomicina 10.000 UI/ml (1 %)] y la suspensión celular resultante se centrifugó a 400 g durante 5 min. Una vez terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml del medio RPMI, y de éstos, se tomó una alícuota para teñirla con una solución de tripán azul (0,2 %) y ácido acético (1 %) en un tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2). Finalmente, se realizó el recuento de las células al microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

Las células de mieloma de ratón que se emplearon en la fusión (P3X63-Ag 8.653), permanecían conservadas en criotubos a una concentración de 5×10^6 células/ml, congeladas a -196°C en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron 6 días antes de la fusión en un baño termostático a 37°C , repartiéndose en frascos de cultivo celular en alícuotas de 0,5 ml de volumen, a los que se añadían 20 ml de CRPMI [RPMI-1640 + FCS (15 %) + L-Glutamina (1 %) + Penicilina-Estreptomicina 10.000 UI/ml]. Con objeto de revitalizar las células, los frascos se incubaron en una estufa de cultivo celular a 37°C con un 5 % de CO_2 durante 48 h. Una vez que las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmico, viéndose una monocapa como imagen microscópica del cultivo celular, las células se despegaron con una pipeta de las paredes del frasco, y se centrifugaron a 400 g durante 5 min. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml del medio RPMI, y después de una segunda centrifugación a 400 g durante 5 min, de nuevo se eliminó el sobrenadante, y

las células se resuspendieron en el mismo medio. Posteriormente, se tomó una alícuota que se tiñó con una solución de tripán azul (2 %) y ácido acético (1 %) en PBS, y cuando las células se habían teñido, éstas se contaron con una cámara de Neubauer al microscopio.

A continuación, se mezclaron en un tubo de centrífuga la suspensión de linfocitos y la de células de mieloma en una proporción de 5:1, y la mezcla se centrifugó a 400 g durante 5 min. Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y el sedimento celular resultante se resuspendió en RPMI. El proceso se repitió dos veces más, dejando tras la última centrifugación el sedimento celular bien escurrido.

La fusión de los linfocitos y de las células de mieloma de ratón, se realizó en presencia de polietilenglicol 1500 MW (PEG). El PEG fusiona las membranas plasmáticas adyacentes, formando una única célula con dos o más núcleos. Estos núcleos permanecen hasta que las membranas nucleares se disuelven antes de la mitosis. Para la fusión, se añadió al sedimento celular (mezcla de linfocitos y de células de mieloma) 1 ml de PEG calentado previamente a 37°C durante 1 minuto. Después de agitar durante 30 segundos, se añadió 1 ml de medio RPMI durante 1 minuto. En los 3 minutos siguientes, se añadieron 3 ml de RPMI, y pasado ese tiempo, se añadieron 16 ml de RPMI durante 6 minutos. La suspensión celular resultante, se incubó en una estufa de cultivo celular a 37°C con un 5 % de CO₂ durante 15 minutos. Después de centrifugar una vez más la suspensión celular a 400 g durante 15 min, el sedimento compuesto de linfocitos, células de mieloma e hibridomas se resuspendió en 50 ml de CRPMI [RPMI-1640 + FCS (15 %) + L-Glutamina (1 %) + Penicilina-Estreptomicina 10.000 UI/ml], suplementado con un promotor de crecimiento celular BM al 10 %. A continuación, el medio que contenía las células se distribuyó en 6 placas de cultivo estériles de 96 pocillos. Las placas se incubaron 12 h en una estufa de cultivo celular a 37°C y con un 5 % de CO₂.

III. 2. 3. 3. Selección de los hibridomas

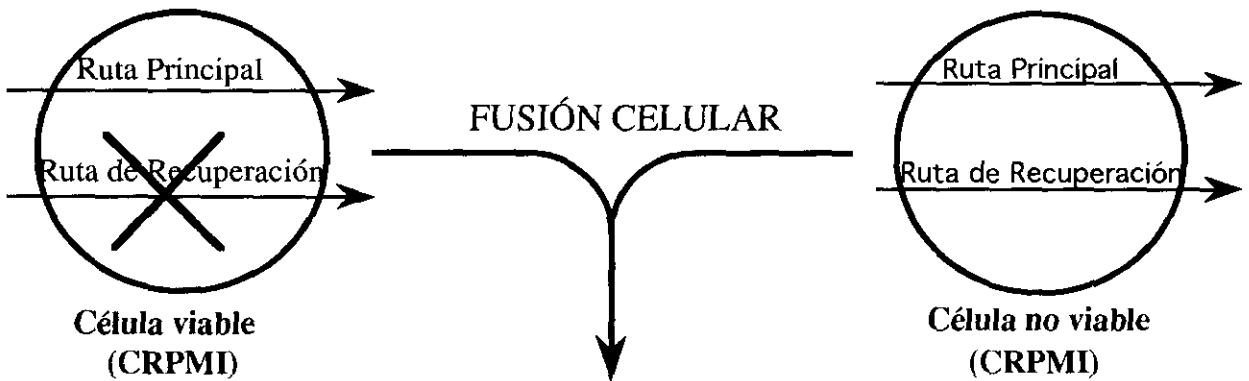
Se realizó según el protocolo descrito por Littlefield (1964). Para que los hibridomas resultantes de la fusión celular puedan crecer en el medio de cultivo, es preciso eliminar las células de mieloma. Para ello, las células de mieloma que se emplearon en la fusión fueron previamente seleccionadas para que tuvieran afuncional una enzima denominada hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT), que interviene en una ruta de recuperación de las bases púricas. Si además, añadimos una sustancia denominada aminopterina en el medio de crecimiento de los hibridomas, ésta bloquea la ruta biosintética principal de los ácidos nucleicos. Por tanto las células de

mieloma morirán, puesto que carecen de la capacidad de sintetizar material genético, ya sea por la ruta principal que está bloqueada, como por la ruta alternativa de la que carecen, al no tener la enzima necesaria. Sin embargo, las células de hibridoma no mueren al contener de los linfocitos, el gen de la HGPRT intacto, disponiendo de la enzima funcional (Figura III.2.).

Por consiguiente, una vez que las placas se incubaron 12 h en una estufa a 37°C con un 5 % de CO₂, se añadió a cada uno de los pocillos de las placas de cultivo celular, 100 µl de un medio selectivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) al 2 %. Las células se mantuvieron en este medio durante 14 días, después de los cuales, se procedió a sustituir el medio HAT por otro medio selectivo HT (Hipoxantina-Timidina) al 2 %. Después de mantener las células durante una semana en medio HT, éste se sustituyó por CRPMI.

MIELOMA (HGPRT afuncional)

LINFOCITO B



MIELOMA (HGPRT afuncional)

HIBRIDOMA

LINFOCITO B

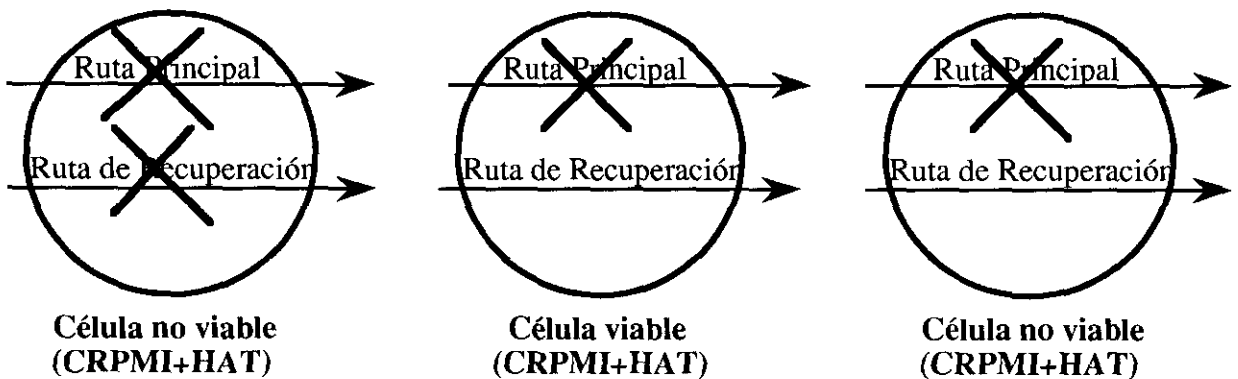


Figura III.2. Mecanismo de selección de las células resultantes de la fusión entre los linfocitos y las células de mieloma de ratón (P3X63-Ag 8653) utilizando la aminopterina, de acuerdo al mecanismo descrito por Littlefield (1964).

Una vez realizada la fusión, con independencia del medio en que se mantienen las células, es preciso eliminar los productos de deshecho segregados por las células en el medio y restituir los nutrientes que éstas requieren en su crecimiento. Para ello, se elimina la mitad del medio de cultivo de cada pocillo (100 μ l) utilizando una micropipeta automática, y a continuación, se reemplaza con medio fresco (100 μ l). Esta "alimentación" de las células se efectúa en condiciones normales cada dos días, aunque si las células crecen rápidamente y el cultivo se densifica, es preciso realizarla con mayor frecuencia.

III. 2. 3. 4. Evaluación de los hibridomas

Dos semanas después de la fusión celular, se procedió a evaluar en los sobrenadantes de los pocillos la presencia de anticuerpos producidos por los hibridomas frente a las caseínas de vaca. Para este análisis, se tomaron alícuotas del medio de crecimiento de los hibridomas para detectar la presencia de dichos anticuerpos utilizando una técnica de ELISA indirecto (III.2.5.1). En esta técnica, el antígeno (caseína de vaca) se fija en los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos y a continuación, se añade el sobrenadante de los pocillos en los que se encuentran los hibridomas. Los anticuerpos producidos por los hibridomas que se unen a las caseínas fijadas en los pocillos, son detectados por un segundo anticuerpo marcado con una enzima que al reaccionar con su sustrato específico, produce una reacción colorimétrica que permite la cuantificación de la unión antígeno-anticuerpo.

Dos días después de la identificación de los hibridomas que producían los anticuerpos frente a las caseínas de vaca, se utilizó de nuevo la técnica de ELISA indirecto, para seleccionar aquéllos que produjesen anticuerpos específicos frente a las caseínas de vaca, sin presentar reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja o cabra.

III. 2. 3. 5. Clonación de los hibridomas

Una vez identificados los hibridomas productores de los anticuerpos específicos frente a las caseínas de vaca, tenemos que asegurar su crecimiento estable a lo largo del tiempo. Los pocillos de las placas de cultivo suelen contener más de un clon de hibridomas. Muchos de estos clones poseen un material genético inestable que impide que produzcan anticuerpos, y si estos clones sobrecrecen, se pueden perder aquéllos hibridomas que producían los anticuerpos monoclonales de interés. Mediante la clonación, se pretende diluir la mezcla inicial de clones hasta conseguir aislar una colonia de células que proceda de un solo clon del hibridoma productor del anticuerpo, y poder asegurar así la secreción estable del anticuerpo.

Para realizar la clonación, se empleó la técnica de dilución límite descrita por Harlow y Lane (1988). Una vez identificados los hibridomas productores de los anticuerpos específicos frente a las caseínas de vaca, se tomó un volumen inicial del medio donde crecían los hibridomas, que contenía un número conocido de células. Este volumen de medio celular se repartió en una placa de 96 pocillos, distribuyéndolo de tal modo, que empezando por la primera columna se depositó un número inicial de células por pocillo y, a continuación, se hicieron diluciones sucesivas hasta el final de la placa.

Si la clonación es efectiva, en las últimas columnas de la placa se llegan a encontrar concentraciones de una sola célula por pocillo. Incluso si se parte de una suspensión de origen unicelular, antes de distribuir el hibridoma en la placa de clonación, no hay muchas garantías de que las colonias no surgan de dos células que estaban juntas. Por consiguiente, para generar el clon es conveniente repetir la clonación. Así, se repitió el proceso tres veces hasta demostrar, mediante la técnica de ELISA indirecto, que los últimos pocillos de la placa que contenían un número menor de células eran también los últimos pocillos donde la reacción colorimétrica tenía lugar como consecuencia de la actividad del anticuerpo.

La densidad celular es un factor crítico para el crecimiento de los hibridomas. Durante la clonación la densidad celular disminuye, y se enlentece el crecimiento de los hibridomas. Por ello se recomienda (Goding, 1986), añadir al medio de cultivo de los hibridomas, poblaciones celulares de crecimiento lento con el fin de que aporten los factores de crecimiento necesarios para la supervivencia y multiplicación de los hibridomas. Durante la clonación de los hibridomas, se añadieron a cada pocillo una concentración aproximada de 10^6 células procedentes del timo de ratones lactantes de la estirpe Balb/c.

III. 2. 3. 6. Expansión y congelación de los hibridomas

Una vez asegurado el origen unicelular del clon del hibridoma productor del anticuerpo específico, se hicieron subcultivos en CRPMI suplementado con un 10 % de BM, transfiriendo las células desde las placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos y de éstas a otras de 6 pocillos. Finalmente, se transfirieron las células a frascos de cultivo de 80 cm² de superficie. El objetivo de crecer la línea celular era disponer de un volumen celular de reserva para su congelación.

Para congelar los hibridomas, éstos se recogieron utilizando una pipeta pasteur de plástico estéril de los frascos de cultivo y a continuación, la suspensión celular se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. Una vez terminada

la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución que contenía un 90 % de suero fetal bovino (CFS) y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). La suspensión celular con una concentración de 5×10^6 células/ml, se alicuotó en criotubos, y éstos se introdujeron en una caja de poliuretano, que se mantuvo en un arcón congelador a -85°C . Posteriormente, los criotubos colocados en pajuelas, se introdujeron en nitrógeno líquido (-196°C) para su conservación.

III. 2. 3. 7. Obtención a gran escala de los anticuerpos monoclonales

Las células del hibridoma productoras de los anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de la leche de vaca, se inocularon en un lote de 10 ratones machos Balb/c de 10 semanas de edad, sensibilizados previamente mediante la inoculación intraperitoneal de 0,5 ml del Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Tres días después de la inoculación del AIF, se inoculó intraperitonealmente a cada ratón 3×10^6 células del hibridoma resuspendidas en 300 μl de un tampón fosfato salino estéril (PBS, pH 7,2). Dos semanas después de la inoculación de los hibridomas, se recogió el líquido ascítico producido en los tumores, y los anticuerpos segregados por las células se purificaron parcialmente por precipitación con sulfato amónico.

III. 2. 3. 8. Tipificación de los anticuerpos monoclonales

La clase y la subclase del anticuerpo monoclonal se determinó mediante un ELISA sandwich, utilizando un inmunosuero comercial obtenido en cabra frente a las inmunoglobulinas de ratón (Ig G₁, Ig G_{2a}, Ig G_{2b}, Ig M e Ig A). En esta técnica, en los pocillos de una placa de poliestireno se depositan los anticuerpos comerciales de cabra frente a las inmunoglobulinas de ratón. A continuación, se añade a cada pocillo el anticuerpo monoclonal que se quiere caracterizar. Posteriormente, los anticuerpos que se han quedado anclados por los de captura se detectan al añadir un segundo anticuerpo obtenido en conejo de forma inespecífica frente a todas las inmunoglobulinas de ratón. Este anticuerpo está marcado con una enzima que al reaccionar con su sustrato específico, produce una reacción colorimétrica que permite la cuantificación de la unión antígeno-anticuerpo.

III. 2. 3. 9. Purificación parcial de los anticuerpos

La precipitación con sulfato amónico es uno de los métodos más utilizados para la separación de las proteínas de una solución acuosa. Cuando se añaden concentraciones elevadas de iones amonio y sulfato, éstos compiten con las proteínas en su unión por el agua. De esta forma, las proteínas al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad lo que

origina su precipitación. La concentración de sulfato amónico más conveniente para precipitar anticuerpos es del 50 %. Uno de los inconvenientes de precipitar los anticuerpos con sulfato amónico es que los anticuerpos así purificados están contaminados por otras proteínas de alto peso molecular que quedan retenidas en los flóculos del precipitado.

La purificación parcial de los anticuerpos monoclonales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Harlow y Lane (1988). Para ello, 1 ml de líquido ascítico se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos. Una vez centrifugado se recogió el sobrenadante, al que se añadió en agitación, un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio 4,1 M pH 7,4. Seguidamente, la solución se mantuvo en reposo a 4°C durante 12 h y se volvió a centrifugar a 3000 g durante 30 min para recuperar las inmunoglobulinas precipitadas. Eliminado el sobrenadante, las inmunoglobulinas presentes en el sedimento se resuspendieron en 2 ml de un tampón fosfato salino (PBS, de pH 7,2), y a continuación, se dializaron frente a PBS durante 12 h a 4°C. Terminada la diálisis, las inmunoglobulinas se alicuotaron en viales de 2 ml, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

III. 2. 3. 10. Determinación de la concentración de inmunoglobulinas del líquido ascítico purificado

Finalmente, para determinar la concentración del anticuerpo en el líquido ascítico purificado, se procedió a medir la absorbancia del mismo a 280 nm utilizando el factor de conversión descrito por Layne (1957), Harlow y Lane (1988) y Peterson (1983), que establece para las Ig G, un valor de absorbancia de 1,35, cuando la concentración proteica es de 1 mg/ml.

El método para determinar la concentración proteica de una muestra mediante la cuantificación de la absorbancia a 280 nm, presenta las ventajas frente a otros métodos convencionales, como el Lowry o el Bradford (III.2.3.1), de ser más rápido y de no requerir la destrucción de la muestra. La técnica se basa en medir la absorbancia máxima de una muestra a 280 nm, que se debe esencialmente a la presencia de tirosina y triptófano.

III. 2. 3. 11. Conjugación de los anticuerpos purificados con la digoxigenina

La detección y cuantificación de un antígeno o anticuerpo por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), requiere la utilización de anticuerpos que están conjugados a una enzima. Aunque la preparación de estos conjugados generalmente se basa en la interacción covalente entre el enzima y el anticuerpo (Nakane y Kawaoi, 1974), en los últimos años se han utilizado

otros sistemas de detección enzimáticos más sensibles. La conjugación de los anticuerpos a la biotina y su detección con conjugados de estreptavidina ha sido uno de los sistemas más utilizados (Bonnard y col., 1984). Sin embargo, recientemente se han propuesto otras técnicas que incrementan la sensibilidad, y eliminan la inespecificidad de la señal, que en ciertos casos, se asociaba al sistema biotina-avidina. En este trabajo, los anticuerpos se conjugaron a la digoxigenina siguiendo el protocolo descrito por Zischler y col., (1989). Los anticuerpos conjugados a la digoxigenina se detectaron con los fragmentos de la región variable de anticuerpos comerciales (F_{ab}), obtenidos en oveja frente a la digoxigenina y conjugados a una enzima.

La digoxigenina es una molécula de bajo peso molecular. Debido a su pequeño tamaño molecular, su unión con el anticuerpo es más estable que cuando éste se conjuga directamente con una enzima. Además, el pequeño tamaño de la digoxigenina permite que cada inmunoglobulina se una a varias moléculas de digoxigenina, y por consiguiente, facilita que a cada inmunoglobulina conjugada se unan varios anticuerpos anti-digoxigenina. De esta forma, la estequiometría de la reacción entre los dos anticuerpos permite detectar el antígeno con una sensibilidad mayor. La unión de la digoxigenina con el anticuerpo es fácil de realizar, y presenta la ventaja de que el anticuerpo no pierde la especificidad por el antígeno.

En la conjugación de los anticuerpos se empleó un éster de la digoxigenina denominado N-hidroxisuccinimida digoxigenina-3-O-succinil- ϵ -aminocaproato, que se resuspendió en dimetilsulfóxido a una concentración de 2 mg/ml. Seguidamente, los anticuerpos purificados se disolvieron en un tampón PBS de pH 7,2, a una concentración de 1 mg/ml, y la solución de digoxigenina se añadió a la del anticuerpo, en una relación molar digoxigenina/anticuerpo de 10:1. La mezcla resultante se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar la digoxigenina libre se empleó una técnica de cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna de Sephadex G-25. En primer lugar, se equilibró el relleno de la columna con 30 ml del tampón PBS y a continuación, se dejó pasar la mezcla digoxigenina-anticuerpo. La elución del anticuerpo conjugado y de la digoxigenina libre se hizo con el tampón PBS, recogiendo fracciones de 0,5 ml. Posteriormente, se midió la absorbancia de las fracciones eluidas a 280 nm. La lectura de los valores obtenidos demostró la existencia de dos picos, que se correspondían con el anticuerpo conjugado y la digoxigenina libre. Los anticuerpos purificados y conjugados se alicuotaron conservándose a -20°C , hasta el momento de su utilización.

III. 2. 4. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

A diferencia de los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales son una mezcla heterogénea de anticuerpos procedentes de muchos clones de linfocitos B, y por ello, reaccionan frente a distintos determinantes antigénicos. Estos anticuerpos, se encuentran en el suero de animales de laboratorio que están sometidos a la exposición continuada de un antígeno, y por ello, su disponibilidad es limitada.

El hecho de que la afinidad y la especificidad de estos anticuerpos sean variables según los lotes de animales empleados en la inmunización, obliga a purificar los inmunosueros, mediante técnicas de purificación largas y costosas. Sin embargo, el bajo coste de su obtención hace en ciertos casos conveniente su obtención.

III. 2. 4. 1. Pauta de inmunización

Para la producción de inmunosueros, se empleó un lote de 3 conejos machos de raza neozelandesa, de 2,5 Kg de peso. El lote se inoculó con la fracción β -caseína de la leche de vaca, purificada por FPLC según se describió en el apartado III.2.1.2.

La inmunización comenzó con la inoculación intradérmica, repartida en varios lugares del dorso, del antígeno (5 mg) emulsionado en una mezcla a partes iguales (0,5 ml) de Adyuvante Completo de Freund y de suero fisiológico estéril (NaCl al 0,85 % p/v). Las dosis siguientes se inocularon vía intramuscular, durante un periodo de 4 meses a intervalos de 7 días (Tabla III.2.), sustituyendo, a partir de la segunda inyección, el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto.

Antes de la primera inoculación del antígeno y para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a dicho antígeno utilizado, se realizó una sangría inicial (s_0). Asimismo, a los 45, 66, 88 y 108 días de la primera inoculación, se realizaron sangrías parciales de la arteria central de la oreja, con el fin de verificar la eficacia del proceso de inmunización.

Para comprobar la producción de anticuerpos frente a las caseínas de vaca, se utilizó la técnica del ELISA indirecto, empleando los inmunosueros procedentes de las sangrías parciales realizadas a los conejos. Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras de inmunosero, demostraron que el título de los sueros era suficiente para proceder a la sangría final de los conejos.

Tabla III.2. Pauta de inmunización de los conejos por inoculación de la β -caseína de la leche de vaca

Días	β -caseína (mg)	Inoculación (ml)	SFE (ml)	ACF (ml)	AIF (ml)	Sangría
0	5	ID	0,5	0,5	—	S ₀
10	5	IM	0,5	—	0,5	
31	5	IM	0,5	—	0,5	
38	5	IM	0,5	—	0,5	S ₁
45	5	IM	0,5	—	0,5	
54	5	ID	0,5	—	0,5	
59	5	IM	0,5	—	0,5	S ₂
66	5	IM	0,5	—	0,5	
73	5	IM	0,5	—	0,5	
77	5	IM	0,5	—	0,5	S ₃
88	5	IM	0,5	—	0,5	
94	5	IM	0,5	—	0,5	
101	5	IM	0,5	—	0,5	S ₄
108	5	IM	0,5	—	0,5	
111	—	—	—	—	—	S _F

ID: Intradérmica SFE: Suero fisiológico estéril S₀: Sangría inicial
IM: Intramuscular ACF: Adyuvante Completo de Freund S₁: Sangría día 45
AIF: Adyuvante Incompleto de Freund S₂: Sangría día 66
S₃: Sangría día 88
S₄: Sangría día 108
S_F: Sangría final

III. 2. 4. 2. Sangría final

A los 111 días del comienzo del proceso de inmunización y una vez comprobado que el título de los inmunosueros era el adecuado, se efectuó la sangría final de los animales. Para ello, se anestesiaron los animales vía intravenosa en la vena marginal de la oreja con pentobarbital (35 mg/Kg de peso). A continuación, se colocaron sobre una mesa en posición de decúbito supino, inmovilizándoles las cuatro extremidades y seguidamente, se les introdujo una aguja (18G) entre el cuarto y el quinto espacio intercostal de la región torácica. Cuando la aguja ya estaba en posición intracardiaca, se fue recogiendo el plasma sanguíneo en tubos de vidrio hasta el desangrado completo del animal.

III. 2. 4. 3. Obtención y conservación del suero

La sangre obtenida se mantuvo durante 3 h a temperatura ambiente, para facilitar la formación del coágulo. A continuación, se separó cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se mantuvo a 4°C durante 18 h para favorecer su retracción. El suero se transvasó a tubos de centrifuga y se centrifugó durante 20 min a 700 g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro, y se alicuotó previa adición de azida de sodio (0,01 % p/v). Las fracciones alicuotadas en viales se conservaron en congelación a -20°C, hasta el momento de su utilización.

III. 2. 4. 4. Purificación parcial de los inmunosueros

Se procedió a purificar los inmunosueros obtenidos frente a la β -caseína de la leche de vaca mediante precipitación selectiva con sulfato amónico al 50 %, de acuerdo al protocolo descrito en el apartado III.2.3.8.

III. 2. 5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

III. 2. 5. 1. Técnica del ELISA indirecto

En esta técnica, los antígenos de la muestra se fijan por adsorción pasiva a una superficie inerte (placas de poliestireno de 96 pocillos). Seguidamente, se añaden los anticuerpos específicos que al reconocer al antígeno quedan unidos a él. Después de un lavado que elimina las moléculas que no han reaccionado, aquellos anticuerpos que han quedado unidos al antígeno fijado a la placa se detectan por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. Se lava de nuevo la placa, y se añade a continuación el sustrato de la enzima, y ambos al reaccionar producen un compuesto coloreado. La intensidad de color que se produce en la reacción es proporcional a la concentración del antígeno de la muestra.

Antígenos:

Como antígenos se emplearon leches y quesos cuya procedencia se indica en el apartado III.1.3.1.

Se prepararon dos tipos de mezclas de leche cruda, una de vaca/oveja y otra de vaca/cabra, añadiendo a las leches de oveja o cabra cantidades crecientes de leches de vaca (0,5; 1, 2,5; 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 %). Asimismo, se preparó una mezcla vaca/oveja con leche de oveja a la que se añadían cantidades crecientes (0,5; 1, 2,5; 5, 10, 15, 25, 50, 75, y 100 %) de

leches de vaca comerciales tratadas térmicamente (pasteurizada, esterilizada y UHT).

La identificación del origen animal de una leche en quesos hubiera requerido una elaboración controlada de los quesos a partir de las mezclas lácteas que se hubieran preparado previamente. Sin embargo, y dado que carecíamos de la infraestructura necesaria para su realización, se procedió a preparar las muestras utilizando quesos adquiridos en centros comerciales. Como estándares se emplearon quesos genuinos elaborados a partir de leche de vaca, oveja o cabra y, las mezclas se prepararon incorporando en quesos genuinos de oveja o cabra, cantidades crecientes de quesos de vaca (0,5; 1, 2,5; 5, 10, 15, 25, 50, y 100 %). Los extractos de queso (25 g) se homogeneizaron en 500 ml de tampón PBS, pH 7,2. Para eliminar la grasa, los homogeneizados se filtraron por lana de vidrio, y posteriormente, se alicuotaron en fracciones de 1 ml, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

Anticuerpos:

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti- β -caseína de la leche de vaca obtenidos en ratones y purificados parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico al 50 %.

Conjugado:

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en conejo y marcadas con peroxidasa de rábano.

Tampones y reactivos:

1.- Tampón PBS

Se compone de:

NaCl	_____	0,14 M
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	_____	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	_____	1,5 mM
KCl	_____	2,7 mM
pH	_____	7,2

2.- Tampón PBST

Se prepara como el tampón PBS y se le añade un 1 % de Tween 20, si es para diluir los anticuerpos y un 5 %, si es para lavar las placas.

3.- Sustrato

Se preparó resuspendiendo el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina sulfónico (ABTS), a una concentración de 1 mg/ml en un tampón comercial (Boehringer) que contenía perborato sódico, ácido cítrico y Na_2HPO_4 .

4.- Solución de tapizado

Se preparó resuspendiendo gelatina al 1 % en el tampón PBS.

Metodología del ELISA indirecto:

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μl del antígeno correspondiente, diluido en PBS y la placa se incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 6 veces con tampón PBST. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 μl de gelatina al 1 % en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37°C y los pocillos se lavaron 6 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 100 μl del anticuerpo monoclonal anti-caseína de leche de vaca, diluido en tampón PBST y la placa se incubó en un agitador de placas de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron de nuevo 6 veces con tampón PBST para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se depositaron en cada pocillo 100 μl del conjugado diluido en tampón PBST, y de nuevo, la placa se mantuvo en el agitador durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 6 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 15 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por la enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control del antígeno: gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato
- Control del anticuerpo: antígeno + gelatina + conjugado + sustrato
- Control del conjugado: gelatina + conjugado + sustrato
- Control del sustrato: gelatina + sustrato

Si la absorbancia a 405 nm de alguno de los controles era mayor de 0,150, el experimento se consideraba nulo.

III. 2. 5. 2. Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina

La diferencia entre esta técnica y la técnica del ELISA indirecto descrita en el apartado III.2.5.1., radica en el empleo de anticuerpos conjugados a la biotina y en su detección por un conjugado comercial de avidina marcada con una enzima (III.2.3.11). El hecho de conjugar los anticuerpos a la biotina para su detección posterior con la avidina, se debe a la gran afinidad (10^{15} M^{-1}) que tiene la avidina por la biotina. El complejo que se forma por la unión avidina-biotina permite amplificar la sensibilidad de las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). En una primera fase, el pequeño tamaño molecular de la biotina favorece que por cada inmunoglobulina se unan varias moléculas de biotina. Posteriormente, al contener la avidina varios lugares de unión con la biotina, permite que por cada inmunoglobulina conjugada a la biotina se unan varias moléculas de avidina. Por consiguiente, la estequiometría de la reacción (1: 4), permite detectar la molécula del antígeno con una sensibilidad mayor.

Como antígenos se emplearon las fracciones caseínicas purificadas por FPLC (III.2.1.2) que se caracterizaron parcialmente por SDS-PAGE electroforesis (III.2.2.2).

En esta técnica, se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en cabra frente a las caseínas de vaca, purificados por cromatografía de afinidad y biotinizados por Rodríguez y col., 1993. Para su desarrollo, se siguieron los mismos pasos y tiempos de incubación que los descritos para el ELISA indirecto (III.2.5.1), con la única diferencia del uso de un conjugado comercial de avidina marcada con peroxidasa de rábano.

III. 2. 5. 3. Técnica del ELISA competitivo

En esta técnica, el antígeno se fija a una superficie sólida (placas de poliestireno de 96 pocillos) a una concentración conocida. A continuación, se añade el antígeno de la muestra o del patrón junto con el anticuerpo específico, estableciéndose una competición entre el antígeno añadido y el fijado a la fase sólida, en su unión por el anticuerpo. Cuanto mayor sea la concentración del antígeno de la muestra, más inhibida estará la unión del anticuerpo al antígeno fijado a la superficie sólida. Después de un lavado que elimina todas las moléculas que no hayan reaccionado, aquellos anticuerpos que quedaron unidos al antígeno de la superficie sólida son reconocidos por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. A continuación, se añade el sustrato de la enzima y ambos al reaccionar provocan la formación de un compuesto coloreado. La intensidad de color que se produce en la reacción es inversamente proporcional a la concentración del antígeno de la muestra.

Antígenos:

Para tapizar la superficie sólida de las placas se empleó una β -caseína comercial de leche de vaca. Como muestras se utilizaron las mezclas experimentales de leches crudas y quesos que se han descrito en el apartado III.2.5.1.

Anticuerpos:

Se utilizaron los mismos anticuerpos que en el ELISA indirecto (III.2.5.1).

Conjugado:

Se empleó el mismo conjugado comercial que en el ELISA indirecto (III.2.5.1).

Tampones y Reactivos:

El tampón PBS, el tampón PBST, el sustrato y la solución de tapizado utilizados se prepararon de igual forma que los descritos en el apartado III.2.5.1.

Metodología del ELISA competitivo:

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 200 μ l de una β -caseína comercial de leche de vaca, diluida en PBS y la placa se

incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 6 veces con tampón PBST. A continuación, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 µl de gelatina al 1 % en tampón PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37°C y los pocillos se lavaron 6 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la muestra antigénica correspondiente junto con 50 µl del anticuerpo monoclonal anti-caseína de leche de vaca, diluido en tampón PBST y la mezcla se homogeneizó, aspirando y expulsando el volumen líquido repetidas veces con una pipeta multicanal. Posteriormente, la placa se incubó en un agitador de placas de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron de nuevo 6 veces con tampón PBST para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se depositaron en cada pocillo 100 µl del conjugado diluido en tampón PBST, y de nuevo, la placa se mantuvo en el agitador durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 6 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 µl del sustrato, manteniendo la placa en el agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por la enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba se realizaron los siguientes controles:

- Control sin β -caseína: gelatina + muestra + anticuerpo + conjugado + sustrato. Si la absorbancia a 405 nm de este control era mayor de 0,150, el experimento se consideraba nulo.
- Control sin muestra antigénica: β -caseína + gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato. Este es el valor máximo de absorbancia y mínimo de inhibición del anticuerpo.

III. 2. 5. 4. Técnica del ELISA sandwich

En esta técnica, los anticuerpos específicos se fijan a una fase sólida y actúan como anticuerpos de captura de los antígenos problema. Los antígenos anclados son reconocidos por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La reacción se pone de manifiesto porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

Antígeno:

Como antígenos se emplearon los anticuerpos monoclonales específicos (IV.3).

Anticuerpos:

Como anticuerpos de captura se utilizaron los anticuerpos comerciales obtenidos en cabra frente a los distintos isotipos (Ig G₁, Ig G_{2a}, Ig G_{2b}, Ig G₃, Ig M e Ig A) de inmunoglobulinas de ratón. Los anticuerpos de detección eran anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en conejo y marcadas con la peroxidasa de rábano.

Tampones y reactivos:

Se emplearon los mismos reactivos que se describieron en la técnica del ELISA indirecto (III.2.5.1), con la excepción de la solución de tapizado, que no se empleó en este inmunoensayo.

Metodología del ELISA sandwich:

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 µl de los anticuerpos de captura diluidos en un tampón PBS, pH 7,2, manteniéndose la placa en incubación a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 6 veces con tampón PBST para eliminar los anticuerpos no adsorbidos a la placa. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de los antígenos, que en este caso eran los sobrenadantes de las placas de fusión celular (IV.3), diluidos en un tampón PBS, y la placa se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado con PBST, se depositaron en cada pocillo 100 µl de los anticuerpos de detección diluidos en un tampón PBST, y la placa se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar los pocillos 6 veces con agua destilada para eliminar aquellos anticuerpos no adsorbidos a la placa, se añadieron a cada pocillo 100 µl del sustrato, manteniéndose la placa en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por la enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de los pocillos a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas.

III. 2. 5. 5. Técnica del ELISA sandwich utilizando el sistema de amplificación digoxigenina-antidigoxigenina

En esta técnica, la superficie sólida (placas de poliestireno de 96 pocillos) se tapiza con anticuerpos que capturan las moléculas de antígeno de la muestra. Aquellos antígenos que después de un lavado de la placa quedan unidos a los anticuerpos fijados a la fase sólida, son reconocidos por un segundo anticuerpo conjugado a un éster de la digoxigenina denominado N-hidroxi-succinimida digoxigenina-3-O-succinil- ϵ -aminocaproato (III.2.3.11), y el complejo formado es a su vez detectado por un conjugado comercial que contiene los fragmentos variables (F_{ab}) de los anticuerpos anti-digoxigenina obtenidos en oveja y conjugados a la enzima peroxidasa de rábano. Al añadir a continuación el sustrato específico de la enzima se forma un compuesto coloreado y la intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración antigénica de la muestra.

Antígenos:

Como antígenos se emplearon las mezclas experimentales de quesos cuya preparación se describió en el apartado III.2.5.1.

Anticuerpos:

Como anticuerpos de captura se utilizaron los anticuerpos policlonales anti- β -caseína de la leche de vaca obtenidos en conejos según se ha descrito en el apartado III.2.4 y, purificados parcialmente por precipitación selectiva con sulfato amónico.

Como anticuerpos de detección se emplearon los anticuerpos monoclonales anti- β -caseína de la leche de vaca obtenidos en ratones, purificados parcialmente por precipitación selectiva con sulfato amónico y conjugados a la digoxigenina.

Conjugado:

Se empleó un conjugado comercial que contiene los fragmentos variables (F_{ab}) de los anticuerpos anti-digoxigenina obtenidos en oveja y, conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (Boehringer).

Tampones y reactivos:

Además de los descritos en la técnica de ELISA indirecto (III.2.5.1), se utilizó un tampón Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

Metodología del ELISA sandwich:

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μ l de los anticuerpos policlonales de captura diluidos en un tampón PBS, pH 7,2, manteniéndose la placa en incubación a 37°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 6 veces con tampón PBST para eliminar los anticuerpos no adsorbidos a la placa. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l del antígeno correspondiente y la placa se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado con PBST, se depositaron en cada pocillo 100 μ l del anticuerpo monoclonal de detección conjugado a la digoxigenina y la placa se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Después de otro lavado con PBST cuyo fin era eliminar aquellos anticuerpos no adsorbidos a la placa, se añadieron a cada pocillo 100 μ l del conjugado comercial anti-digoxigenina-peroxidasa diluido en tampón Tris-HCl, pH 7,5 y la placa se incubó 1 h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar los pocillos seis veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μ l del sustrato, manteniendo la placa en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El color verde resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de los pocillos a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

Los controles realizados en cada ensayo de ELISA sandwich fueron los siguientes:

- Control del antígeno: anticuerpo de captura + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.
- Control del anticuerpo de captura: antígeno + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.
- Control del anticuerpo de detección: anticuerpo de captura + antígeno + conjugado + sustrato.
- Control sin anticuerpo de captura y sin antígeno: anticuerpo de detección + conjugado + sustrato.
- Control de conjugado: conjugado + sustrato.
- Control de sustrato: sustrato.

III. 2. 5. 6. Técnica de inmunobloting

La técnica del inmunobloting, está basada en la transferencia de proteínas, desde un gel de electroforesis hacia una matriz, que generalmente es una membrana de nitrocelulosa. La transferencia de antígenos proteicos a una membrana de papel, permite con posterioridad, mediante la reacción de dichos antígenos con inmunosueros, definir la especificidad de éstos anticuerpos e incluso purificar aquellos anticuerpos que demuestren ser altamente específicos para un antígeno dado.

Esta técnica presenta numerosas ventajas con respecto a las técnicas electroforéticas habituales (Gershoni y Palade, 1983). Entre las principales, se encuentra el que las membranas de papel se manejan más fácilmente que los geles de electroforesis y, además, las proteínas retenidas en el papel están más accesibles para otros ligandos específicos. Asimismo las membranas de nitrocelulosa pueden conservarse durante meses antes de su utilización. La sensibilidad del inmunobloting es alta, pudiéndose detectar proteínas con ligandos específicos a muy bajas concentraciones (ng/pg). Para su realización es necesario desarrollar las siguientes operaciones:

1.- Pre-equilibrado del gel de electroforesis:

Para realizar el pre-equilibrado, el gel de electroforesis se sumerge en un tampón ("tampón de transferencia"). Con ello, se eliminan tanto las sales que proceden del tampón de electroforesis, como otras que se forman en el tratamiento desnaturante del gel de electroforesis. Si no se eliminaran estas sales, la conductividad eléctrica aumentaría, y la cantidad de calor que se generaría durante la transferencia proteica sería mucho mayor.

2.- Elución de las proteínas del gel y adsorción de éstas a una membrana de nitrocelulosa:

La transferencia de las proteínas del gel de electroforesis a la membrana de nitrocelulosa (0,45 μm), se hizo por corriente eléctrica. Para realizar la electroelución de las proteínas, primeramente se cortó la membrana de nitrocelulosa según las dimensiones del gel y a continuación se sumergió en el tampón de transferencia. Una vez que la membrana estaba bien embebida en el tampón, se colocó con ayuda de un pinzas sobre el gel de electroforesis, evitando la formación de burbujas de aire que pudieran alterar la transferencia. Seguidamente, se hizo un "sandwich" con el gel y la membrana, colocando tanto por encima de la membrana como por debajo del gel, dos almohadillas tipo "Scotch Brite". Posteriormente, el sandwich se introdujo en un soporte plástico de material no conductor, cerrándolo con un seguro de tal forma, que

la unión de la membrana al gel fuera muy firme. A continuación, el soporte se introdujo en una cubeta de plástico que previamente había sido rellena con el tampón de transferencia. Antes de cerrar la cubeta, se introdujo una uña magnética, colocándose la cubeta sobre una placa electromagnética. Esta operación permitió conducir la electricidad uniformemente. Finalmente, se colocó la tapa de la cubeta y se conectó a la fuente de alimentación.

3.- Detección de las proteínas adsorbidas utilizando inmunosueros específicos mediante una técnica inmunoenzimática:

Una vez que la transferencia había terminado, se desconectó la fuente de alimentación y se extrajo la membrana de nitrocelulosa del sandwich. A continuación, la membrana se sumergió en una bandeja de plástico que se había relleno con un tampón de lavado, y se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente en un agitador, renovando el tampón a intervalos de 10 minutos, con el objeto de eliminar aquellas proteínas no adsorbidas a la membrana, así como los restos que hubieran quedado del gel. Después del lavado, se incubó la membrana en una solución de bloqueo durante 1 h a 40°C, con la finalidad de eliminar uniones inespecíficas. Una vez bloqueada la membrana, ésta se lavó de nuevo y se incubó con el anticuerpo correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador. Transcurrido ese tiempo, y después de lavar la membrana 5 veces con el tampón de lavado, para eliminar aquellos anticuerpos no adsorbidos a la membrana, ésta se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador, con un segundo anticuerpo que reconocía como antígeno al primer anticuerpo, y que estaba conjugado a una enzima. Seguidamente, la membrana se lavó 5 veces con agua destilada con el objeto de eliminar los restos de conjugado libre, y se incubó con una solución de sustrato que precipitaba sobre el papel. La degradación del sustrato por la enzima dió lugar a un compuesto coloreado, que permitió el revelado de la reacción. Una vez teñida la membrana, se lavó con agua destilada y se secó para su conservación.

Transferencia de las proteínas desde un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) a una membrana de nitrocelulosa

Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS)

La electroforesis se realizó siguiendo el método de Laemmli (1970), como se ha descrito en el apartado III.2.2.1.

Para realizar la electroforesis, se emplearon como muestras la fracción caseínica entera de la leche de vaca, así como los distintos componentes

aislados (β , k , α_s y α_{s1}) de la caseína de la leche de vaca. Todas las muestras fueron suministradas por una casa comercial.

Tampones y reactivos

Tampón de transferencia

Se compone de:

Tris-HCl	_____	25	mM
Glycine	_____	192	mM
Metanol	_____	20 %	v/v
SDS	_____	0,1 %	p/v
pH	_____	8,3	

Tampón de lavado (TBST)

Contiene:

Tris-HCl	_____	50	mM
NaCl	_____	50	mM
Tween 20	_____	0,1 %	v/v
pH	_____	8,0	

Solución de bloqueo

Es una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % en el tampón TBST.

Solución de sustrato

Se preparó resuspendiendo 0,6 mg de tetrahidrocloruro de 3-3'-diamino-benzidina en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, que contenía un 0,1 % de H_2O_2 (30 % p/v). La solución se filtró por un filtro de papel (Whatman Núm.1) antes de su utilización.

Anticuerpos

Se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos en cabra frente a las caseínas de vaca y purificados por cromatografía de afinidad por Rodríguez y col. (1993).

Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de cabra obtenidas en conejo y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano.

Metodología

La elución de las proteínas se realizó esencialmente como se ha descrito en el apartado III.2.5.6, siguiendo las técnicas desarrolladas por Burnette (1981) y por Gershoni y Palade (1982). La transferencia se realizó orientando la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo, manteniendo el voltaje constante a 60 V y fijando un máximo de intensidad de corriente de 2 mA. La transferencia duró 5 h.

Transferencia de las proteínas desde un gel de poliacrilamida con urea a una membrana de nitrocelulosa

Gel de poliacrilamida con urea

Se realizó la electroforesis según el método de Akroyd (1968), como se ha descrito en el apartado III.2.2.3.

Se emplearon las mismas muestras que en la transferencia desde el gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (III.2.5.6.1).

Tampones y reactivos

Tampón de transferencia

Se compone de una solución de ácido acético glacial al 0,7 % v/v que se enfría a 4°C antes de su empleo.

Tampón de lavado (TBS)

Contiene:

Tris-HCl	_____	10	mM
NaCl	_____	0,9 %	(p/v)
pH	_____	7,4	

Solución de bloqueo

Es una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % en el tampón TBST.

Solución de sustrato

Se empleó la misma solución de sustrato que en la transferencia desde un gel de poliacrilamida con SDS (III.2.5.6.1.)

Anticuerpos

Se emplearon los anticuerpos monoclonales anti- β -caseína de la leche de vaca.

Conjugado

Se utilizó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en conejo y marcadas con el enzima peroxidasa de rábano.

Metodología

La transferencia se realizó según lo descrito en el apartado III.2.5.6, siguiendo la técnica desarrollada por Towbin y col., (1979). Al efectuarse la transferencia en condiciones de pH ácido, se revirtió la polaridad de los electrodos orientando la membrana de nitrocelulosa hacia el cátodo. La elución se realizó manteniendo el voltaje constante a 30 V, fijando un máximo de intensidad de corriente de 0,2 A. El proceso duró 16 h.

III. 2. 5. 7. TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO EN PALETAS

La técnica del ELISA indirecto en paletas es una técnica rápida de fácil realización, que requiere escaso instrumental para su desarrollo. La técnica se realizó siguiendo el método descrito por Skerritt y Hill (1991).

Antígenos:

Se emplearon las muestras de mezclas de leches y quesos que se habían preparado experimentalmente, según lo descrito en el apartado III.2.5.1.

Anticuerpos:

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti- β -caseína de la leche de vaca.

Conjugado:

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en conejo y marcadas con la enzima peroxidasa de rábano.

Tampones y reactivos:

El tampón PBS y el tampón PBST, se prepararon de igual forma que los descritos en el apartado III.2.5.1.

Se utilizaron dos sustratos distintos:

Solución de sustrato (ABTS)

Se preparó resuspendiendo el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina sulfónico (ABTS) a una concentración de 1 mg/ml en un tampón preparado comercialmente (Boehringer) que contenía perborato sódico, ácido cítrico y Na_2HPO_4 .

Solución de sustrato (TMB)

La solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina se obtuvo de una casa comercial (Boehringer).

Solución de tapizado

Se preparó resuspendiendo seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % en el tampón PBS.

Se emplearon dos soluciones de frenado distintas:

Solución de frenado para el ABTS

Es una solución de fluoruro de sodio (NaF) al 2 % en agua destilada.

Solución de frenado para la TMB

Es una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M.

Metodología del ELISA indirecto en paleta:

Las paletas de poliestireno se introdujeron en criotubos de polipropileno (Nunc), en los que se habían depositado 500 μ l de la muestra antigénica correspondiente. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, y en el transcurso de ese tiempo, se enroscaron y desenroscaron los tapones de los criotubos, con objeto de facilitar la adsorción de los antígenos a las paletas. Terminada la incubación, las paletas se lavaron cuidadosamente con agua corriente evitando invertir los tapones. A continuación, para tapizar las zonas de las paletas donde no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron 500 μ l de la solución de tapizado a los criotubos, incubándose las paletas en dicha solución durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual, se lavaron con agua corriente. Seguidamente, se incubaron las paletas con 500 μ l del anticuerpo monoclonal anti-caseína de la leche de vaca durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, las paletas se lavaron de nuevo con agua del grifo para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se incubaron las paletas con 500 μ l de conjugado y se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las paletas con agua del grifo para eliminar los restos de conjugado libre, se incubaron con 500 μ l del sustrato. Después de incubar las paletas en los criotubos con el sustrato durante 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción colorimétrica resultante de la degradación del sustrato por la enzima se detuvo con la solución de frenado. Una vez frenada la reacción, se determinó visualmente la presencia de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos de oveja, comparando las muestras con un control negativo que sólo contenía leche o queso de oveja y con un control positivo que contenía leche o queso de vaca (Figura III.3.).

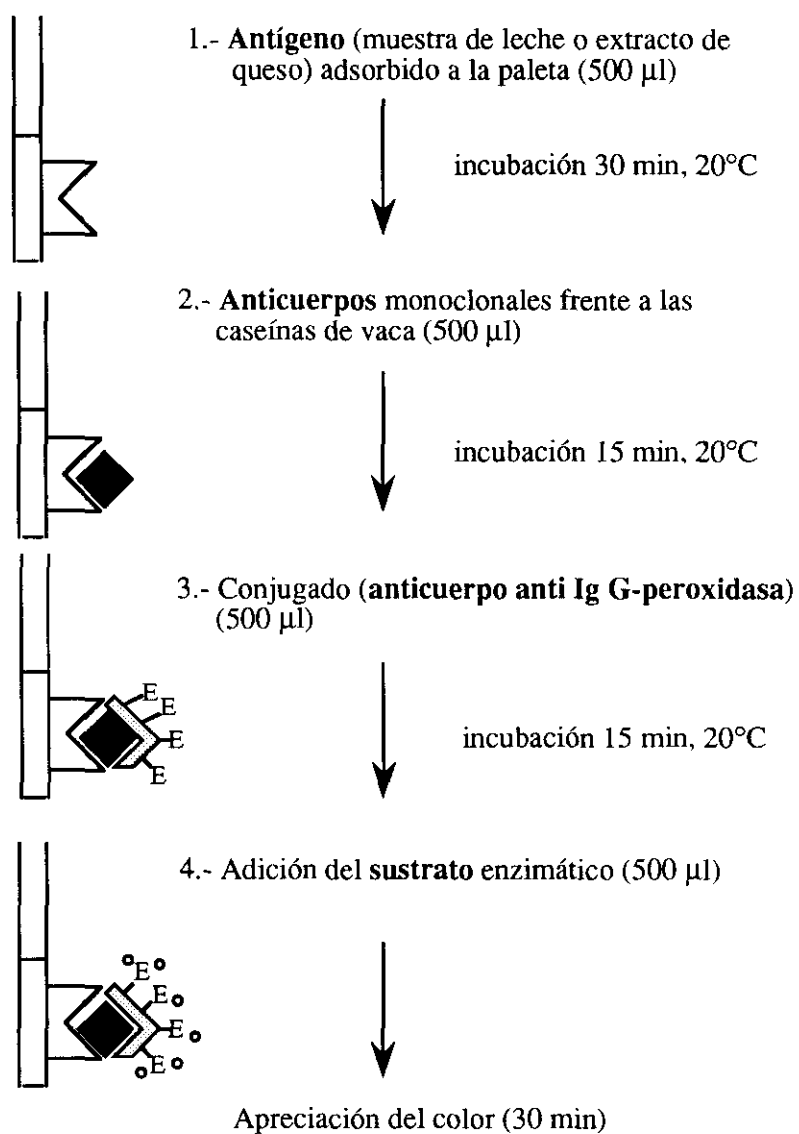
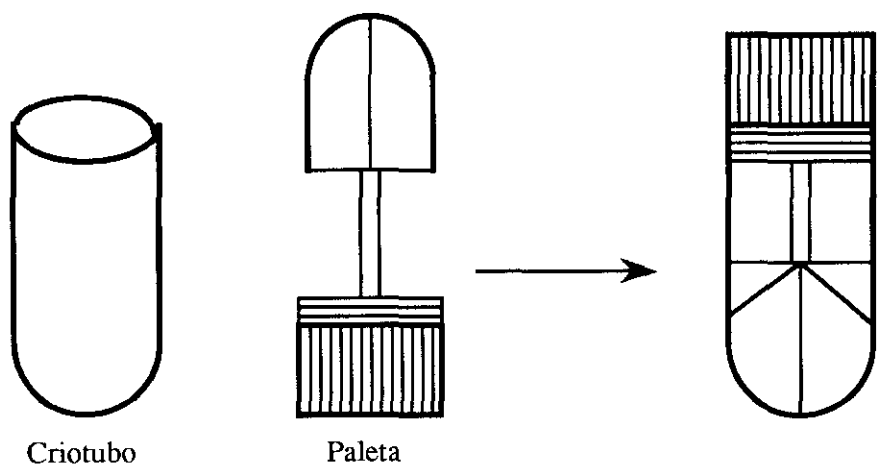


Figura III. 3. Prueba rápida para la detección de la leche de vaca en mezclas lácteas y en quesos utilizando anticuerpos monoclonales.

RESULTADOS

IV. 1. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA

El aislamiento de las distintas fracciones caseínicas de la leche de vaca se realizó a partir de un extracto liofilizado de la caseína entera por cromatografía líquida de alta resolución (FPLC), siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.1.2. En la Figura IV.1., se observan los cuatro picos cromatográficos que se registraron al eluir la muestra de caseína a través de una columna de intercambio aniónico fuerte (Mono Q HR 5/5). Estos picos se identificaron como: κ -, β -, α_{s2} - y α_{s1} -caseínas, al comparar el perfil de elución con los obtenidos previamente por el análisis de unos patrones internos correspondientes a las fracciones caseínicas suministradas por una casa comercial (κ -, β -, α_s - y α_{s1} -caseínas).

Para la separación cromatográfica, se utilizó un flujo de elución de 1 ml/min y un gradiente salino discontinuo de 0 a 0,4 M, que permitiesen eluir separadamente las fracciones caseínicas de la leche de vaca. Sin embargo, y como se observa en la Figura IV.1., la separación entre las fracciones α_{s2} - y α_{s1} -caseínas es incompleta.

Las fracciones eluidas por la columna cromatográfica se dializaron frente a agua destilada, se liofilizaron, y su concentración proteica se determinó de acuerdo al método descrito en el apartado III.2.1.3. Para ello, se construyó una curva patrón con la fracción β -caseína aislada de la leche de vaca (Figura IV.2.). La ecuación de la recta patrón resultante de relacionar los valores de absorbancia y las concentraciones de proteína de los patrones fue:

$$y = -0,00087 + 0,0022 x, r = 1,0.$$

El rendimiento de proteína obtenido fue el siguiente: κ -caseína = 182 μ g, β -caseína = 534,5 μ g, α_{s2} -caseína = 74,8 μ g y α_{s1} -caseína = 476 μ g de proteína/mg.

Las fracciones caseínicas purificadas por FPLC, se caracterizaron parcialmente mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS), utilizando un aparato PhastSystem (III.2.2.2). Como se observa en la Figura IV.3., la migración de las caseínas en el gel de electroforesis se establece de acuerdo a su peso molecular, siendo la fracción de κ -caseína (19 KDa) la que migra a mayor distancia del origen, seguida de la β -caseína (23,9 KDa), de la α_{s1} -caseína (23,6 KDa) y de la α_{s2} -caseína (25,2 KDa).

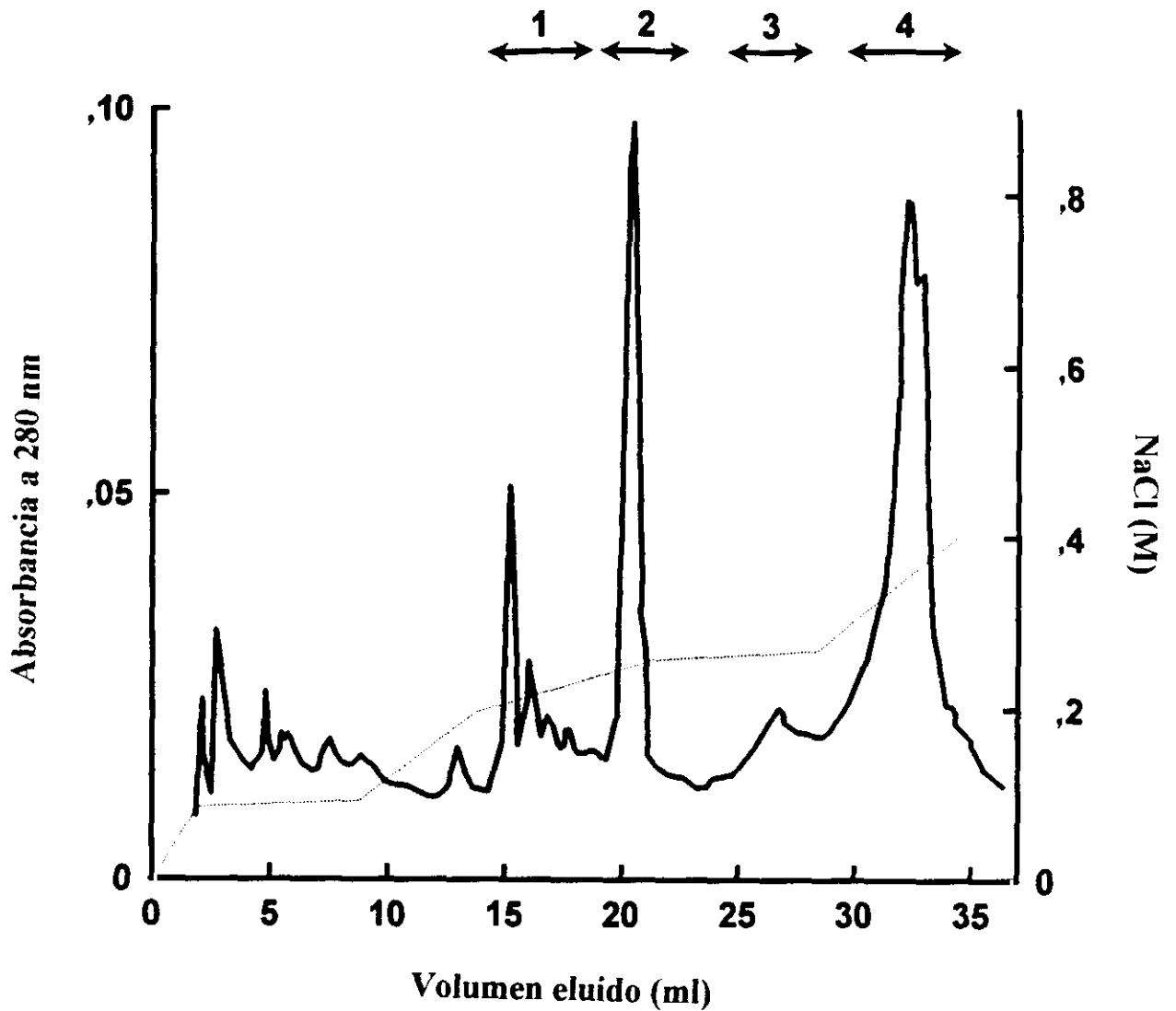


Figura IV.1. Perfil de elución de las caseínas de la leche de vaca obtenido al fraccionar la caseína entera en sus componentes utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (FPLC). Para la separación se utilizó una columna cromatográfica de intercambio aniónico fuerte (Mono Q HR 5/5). Las fracciones eluidas fueron: (1) κ -caseína, (2) β -caseína, (3) α_{s2} -caseína (4) α_{s1} -caseína.

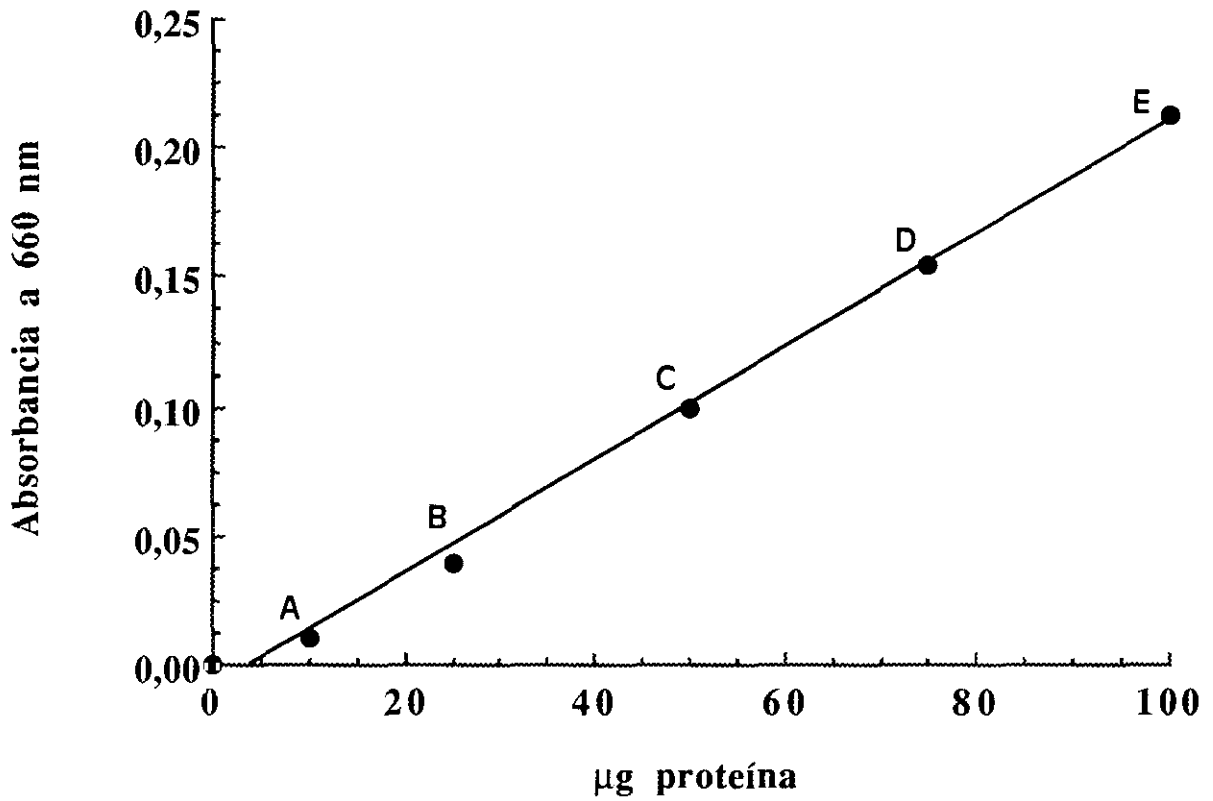


Figura IV. 2. Recta patrón para la determinación de la concentración de proteína de las fracciones caseínicas purificadas por el FPLC siguiendo la técnica descrita por Markwell (1978). Concentración de la proteína patrón (β -caseína de leche de vaca): (A) 10 $\mu\text{g/ml}$; (B) 25 $\mu\text{g/ml}$; (C) 50 $\mu\text{g/ml}$; (D) 75 $\mu\text{g/ml}$; (E) 100 $\mu\text{g/ml}$.



Figura IV.3. Migración electroforética de las caseínas de la leche de vaca en un gel de poliacrilamida con SDS (12,5 %), utilizando un aparato PhastSystem™. (A) α_{s1} -caseína, (B) α_{s2} -caseína, (C) β -caseína, (D) κ -caseína y (E) caseína entera.

Los resultados obtenidos en la electroforesis realizada confirmaron que las fracciones aisladas por FPLC eran homogéneas, con la excepción de las α_{s1} -caseínas ya que las bandas proteicas del gel de electroforesis demuestran que la fracción identificada como α_{s2} -caseína contiene, además, restos de β - y α_{s1} -caseínas. Asimismo, la comparación del perfil electroforético obtenido para las fracciones de caseína de vaca, aisladas por FPLC, con los resultados publicados por otros autores (Mikkelsen y col., 1987), permite verificar que la distancia recorrida en el gel por la α_{s1} -caseína es sensiblemente inferior a la que le correspondería en base a su peso molecular. Este hecho probablemente se debe a que la fracción 4 separada por FPLC (Figura IV.1.) e identificada como α_{s1} -caseína, contiene además restos de α_{s2} -caseína.

IV. 2. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA

Las fracciones de la caseína de vaca purificadas por FPLC, se caracterizaron inmunológicamente utilizando anticuerpos policlonales obtenidos en cabra frente a las caseínas de vaca y una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto (III.2.5.2). Los anticuerpos policlonales utilizados se purificaron por cromatografía de afinidad, para eliminar aquellos anticuerpos que reconocían a las caseínas de otras especies animales, y se conjugaron a la biotina por Rodríguez y col., (1993). Experimentos previos demostraron que la dilución óptima para el empleo de los anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca (1 mg/ml) era la 1:500 y la del conjugado comercial de estreptavidina-peroxidasa, la 1:1000.

Los resultados obtenidos en la técnica del ELISA indirecto desarrollado en este trabajo, demostraron que los anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca reconocían intensamente la fracción β -caseína, siendo los valores máximos de absorbancia obtenidos próximos a los alcanzados frente a la caseína entera de vaca (Figura IV.4.). La especificidad de estos anticuerpos para reconocer al resto de las caseínas fue en orden decreciente la siguiente: β -, κ -, α_{s2} - y α_{s1} -caseínas.

Los resultados obtenidos con el ELISA indirecto desarrollado se confirmaron utilizando una técnica de inmunobloting. Para ello, inicialmente se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (III.2.2.1) y una vez que las caseínas se habían separado en el gel de electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.5.6. Finalizada la transferencia, las bandas de proteína correspondientes a las fracciones separadas de caseína se detectaron utilizando los anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca. Experimentos

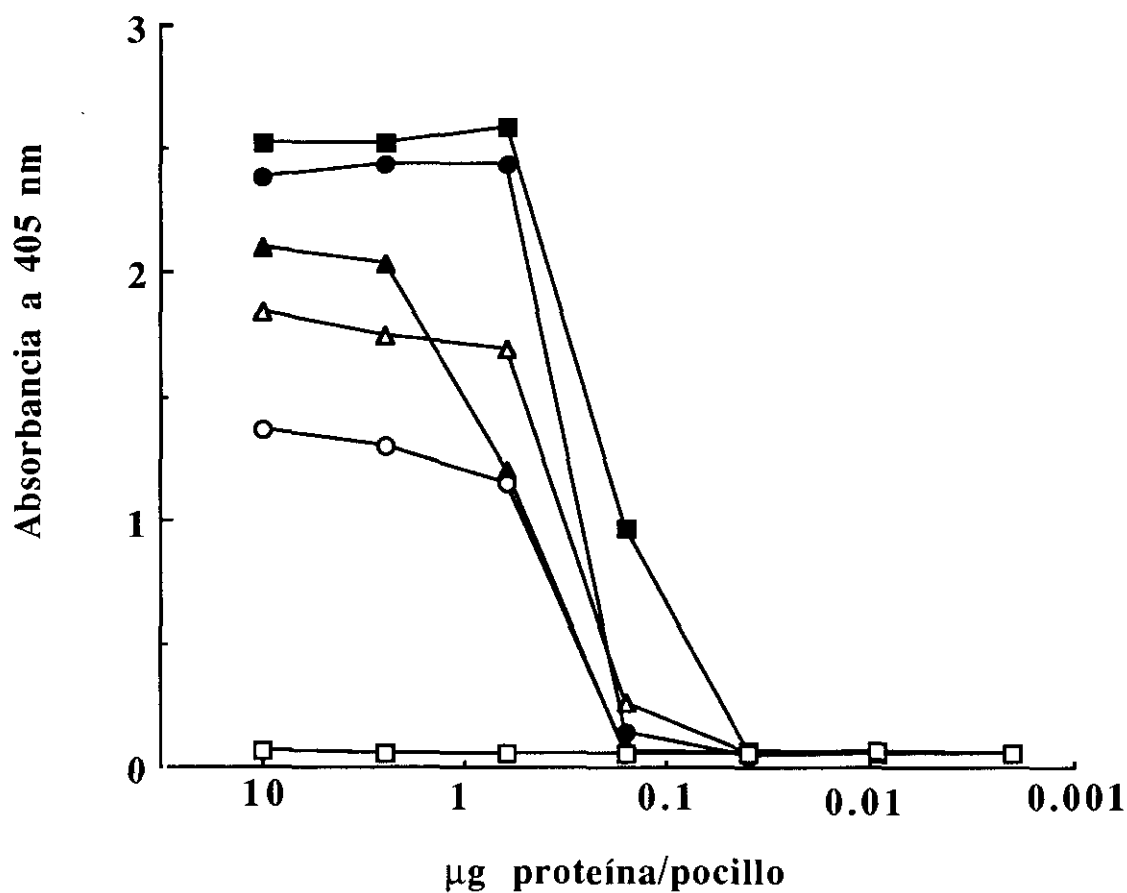


Figura IV.4. Caracterización inmunológica de las fracciones aisladas de la caseína de la leche de vaca por FPLC, utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca y una técnica de ELISA indirecto. (■) caseína entera de vaca, (●) β-caseína, (▲) κ-caseína, (Δ) α₂-caseína, (○) α₁-caseína y (□) caseína entera de cabra.

previos demostraron que la dilución óptima para el empleo de los anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca (1 mg/ml) y la del conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de cabra marcadas con la peroxidasa era la 1:2000, en ambos casos. La adición del sustrato de diaminobenzidina permitió detectar en la membrana de nitrocelulosa las bandas coloreadas correspondientes a los lugares de unión de los anticuerpos a las fracciones caseínicas separadas por electroforesis. Como se observa en la Figura IV.5., la banda más intensa corresponde a la β -caseína, seguida en un orden decreciente de intensidad de color por las bandas correspondientes a la κ -caseína y α -caseínas.

La técnica de inmunobloting permitió confirmar los resultados que previamente se habían obtenido con la técnica del ELISA indirecto. De los resultados obtenidos se deduce que la fracción β -caseína es la que presenta un mayor número de epítomos especie-específicos, al ser analizada frente a los anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca.

IV. 3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA

Para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos de las caseínas de la leche de vaca, se inmunizaron varios lotes de ratones hembras de la estirpe Balb/c, con la fracción β -caseína purificada por FPLC. Las inoculaciones intraperitoneales se realizaron semanalmente de acuerdo al protocolo descrito en el apartado III.2.3.1.

A los 42 días de la primera inoculación, se realizó una sangría parcial del plexo retroorbitario de los ratones con objeto de comprobar si los animales producían anticuerpos frente a las caseínas de vaca. En la Figura IV.6., se representan gráficamente los valores de absorbancia obtenidos mediante un ELISA indirecto, utilizando los inmunosueros extraídos de la sangría parcial realizada a los ratones. Los resultados confirman la variación individual de la respuesta inmunológica de cada animal inmunizado con la β -caseína de vaca. De los tres ratones del lote analizado, el inmunosero del ratón 1, diluido a la 1:10.000, mostraba valores de absorbancia superiores a 2,0, y por consiguiente, se consideró que el título del suero era suficiente para proceder a la sangría final del ratón. El ratón cuyo inmunosero presentaba el título más alto, se eligió para efectuar la fusión celular con células de mieloma de ratón (P3X63-Ag 8653) de acuerdo al protocolo descrito en el apartado III.2.3.2.

Dos semanas después de la fusión celular y cuando los hibridomas comenzaban a ser visibles en los pocillos, se procedió mediante una técnica de

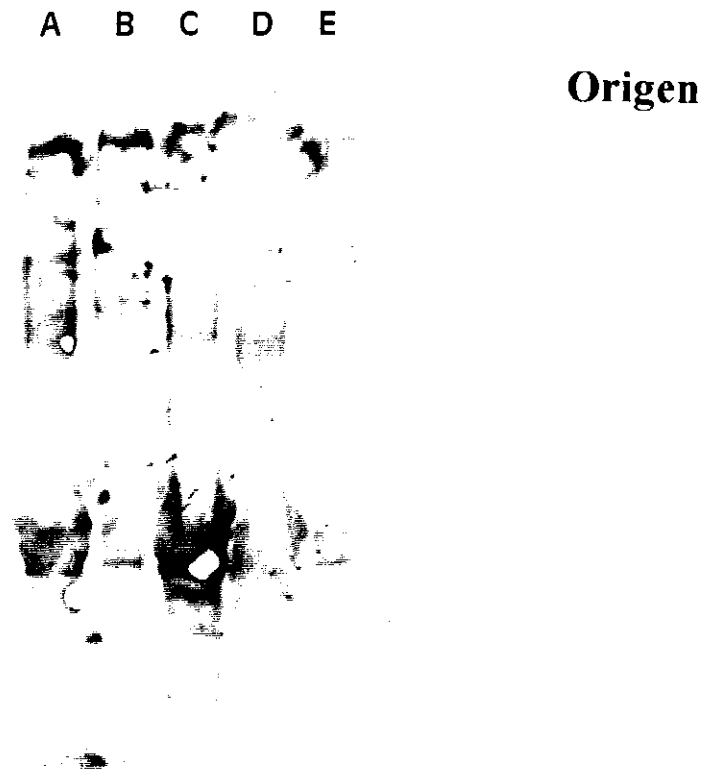


Figura IV.5. Inmunoblotting de las caseínas de vaca transferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-caseína de vaca. (A) caseína entera de vaca, (B) α_s -caseína, (C) β -caseína, (D) κ -caseína y (E) α_{s1} -caseína.

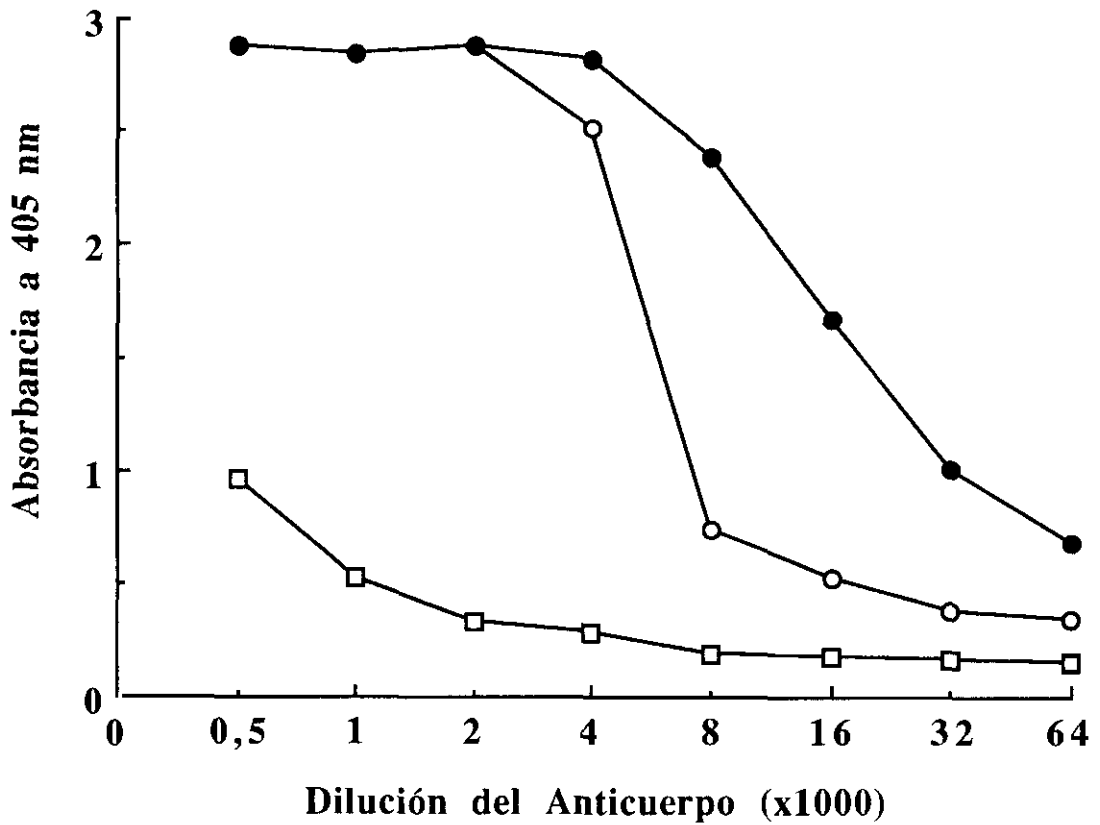


Figura IV.6. Estimación, mediante un ELISA indirecto de la capacidad de los inmunoseros obtenidos en los ratones 1 (●), 2 (○) y 3 (□), para reconocer la caseína entera de la leche de vaca (25 μ g de caseína por pocillo) a los 42 días de la primera inoculación. Dilución del conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa, 1:1500.

ELISA indirecto, a seleccionar aquéllos que producían anticuerpos frente a las caseínas de vaca. Con esta técnica, se identificaron varios hibridomas productores de anticuerpos que reconocían las caseínas de la leche de vaca. De ellos, sólo el hibridoma AH4 reconocía específicamente a las caseínas de vaca, sin presentar reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja y cabra (Tabla IV.1.). Asimismo, el hibridoma AH4 no presentaba ninguna reacción cruzada frente a las proteínas solubles musculares de la carne de vaca, cerdo, pollo y caballo, ni frente a otras proteínas, como la proteína de soja, la seroalbúmina bovina y la gelatina.

La identificación de la clase y subclase del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma AH4 se realizó mediante un formato de ELISA sandwich siguiendo la técnica descrita en el apartado III.2.5.4 y utilizando un conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón. Los resultados obtenidos demostraron que los anticuerpos segregados por el hibridoma AH4 eran Ig G₁.

El hibridoma AH4 se clonó tres veces por la técnica de dilución límite descrita en el apartado III.2.3.5. Tanto el hibridoma aislado inicialmente de las placas de fusión celular como los hibridomas resultantes de las clonaciones sucesivas, se expandieron efectuando subcultivos celulares y se congelaron. Asimismo, los hibridomas obtenidos en la segunda y tercera clonación se inocularon en ratones machos de la estirpe Balb/c, con el fin de producir ascitis en los ratones y así recuperar el líquido generado en la cavidad abdominal de los animales inoculados. Una vez inducida la ascitis, los líquidos ascíticos se purificaron mediante precipitación selectiva con sulfato de amonio.

Asimismo, se utilizó la técnica de inmunobloting para confirmar que los anticuerpos producidos por el hibridoma AH4 reaccionaban específicamente frente a las caseínas de vaca, sin presentar reacciones cruzadas frente a otras proteínas homólogas. Para ello, la caseína entera de las leches de vaca, oveja y cabra, así como las fracciones caseínicas aisladas de la leche de vaca (β , κ , α_s y α_{s1}) se separaron mediante una electroforesis alcalina en un gel de poliacrilamida que contenía urea, de acuerdo a la técnica descrita en el apartado III.2.2.3. Una vez finalizada la electroforesis, las caseínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y a continuación, ésta se incubó con el anticuerpo monoclonal AH4 diluido 1:10.000, en un tampón TBS que contenía un 1 % de BSA. Seguidamente, se añadió un conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en conejo y marcadas con peroxidasa, diluido 1:2000 en un tampón TBS que contenía un 1 % de BSA. Después de la incubación, se adicionó la diaminobenzidina como sustrato de la reacción colorimétrica. La aparición de bandas coloreadas en la membrana de nitroce-

Tabla IV.1. Valores de absorbancia obtenidos en un ELISA indirecto para determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal AH4 para reconocer distintas proteínas

	Anticuerpo monoclonal (AH4)
Proteínas	Absorbancia (405 nm)
Caseínas de vaca	2,124
Caseínas de oveja	0,007
Caseínas de cabra	0,040
Proteínas musculares solubles de vaca	0,032
Proteínas musculares solubles de cerdo	0,044
Proteínas musculares solubles de pollo	0,001
Proteínas musculares solubles de caballo	0,064
Proteína de soja	0,027
Seroalbúmina bovina	0,040
Gelatina	0,002

lulosa, permitió detectar los lugares de unión del anticuerpo monoclonal AH4 a las fracciones caseínicas. La presencia de una banda coloreada correspondiente a la caseína entera de la leche de vaca, demostró la ausencia de reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja y cabra (Figura IV.7.). Asimismo, la visualización de bandas coloreadas correspondientes a las fracciones β - y κ -caseína y la ausencia de reacciones cruzadas frente a las α -caseínas, confirmaron los resultados obtenidos con la técnica del inmunobloting utilizando anticuerpos policlonales anti-caseínas de vaca (Figura IV.5.).

IV. 4. ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL AH4 PARA RECONOCER A LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO

Mediante la técnica del ELISA indirecto descrita en el apartado III.2.5.1, se determinó la capacidad del anticuerpo monoclonal AH4, purificado del líquido ascítico por precipitación selectiva con sulfato amónico, para reaccionar frente a las caseínas de la leche de vaca.

En la Figura IV.8., se puede observar la elevada especificidad del anticuerpo monoclonal AH4 frente a las caseínas de la leche de vaca y en ausencia de reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja y cabra. Por consiguiente, la utilización de este anticuerpo monoclonal en un formato de ELISA indirecto, permite incrementar de forma significativa los niveles de sensibilidad que se habían alcanzado previamente utilizando los anticuerpos policlonales específicos frente a las caseínas de vaca.

IV. 5. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS POR TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)

El anticuerpo monoclonal AH4, específico frente a las caseínas de la leche de vaca, se utilizó en las técnicas inmunoenzimáticas de ELISA indirecto y de ELISA competitivo, para detectar y cuantificar la incorporación de distintos porcentajes de leche de vaca en mezclas lácteas experimentales.

IV. 5. 1. Técnica del ELISA indirecto

Los pocillos de una placa de ELISA se sensibilizaron con leche cruda de vaca, oveja y cabra, diluida 1:50 en tampón PBS. Los resultados obtenidos (Figura IV.9.), demuestran que el anticuerpo monoclonal AH4 diferencia específicamente la leche cruda de vaca, de las leches de oveja y cabra.

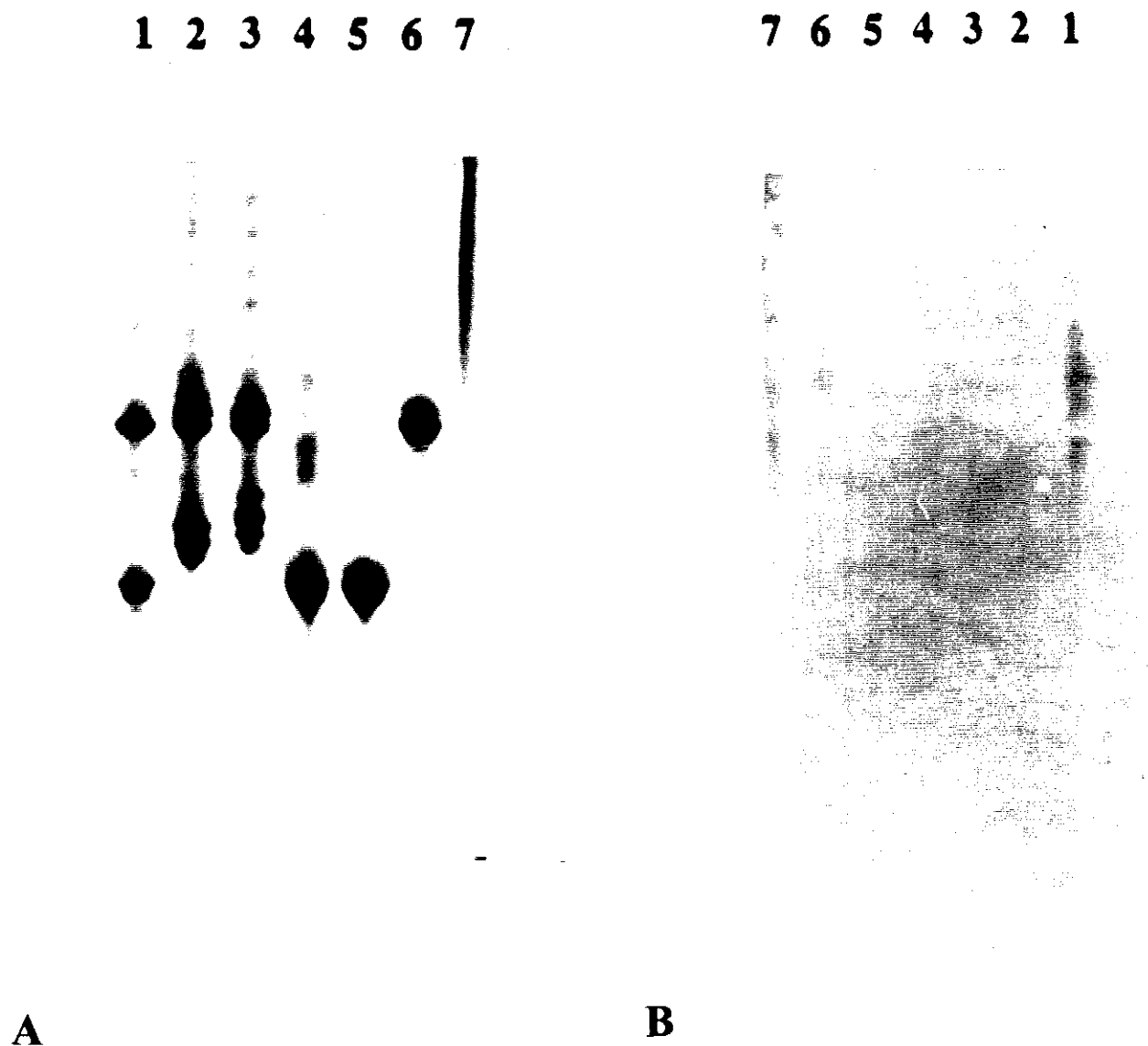


Figura IV.7. Separación electroforética en un gel de poliacrilamida con urea (A) e inmunobloting (B), de (1) la caseína entera de vaca, (2) oveja, y (3) cabra, así como de las fracciones (4) α_s -caseína, (5) α_{s1} -caseína, (6) β -caseína y (7) κ -caseína de vaca.

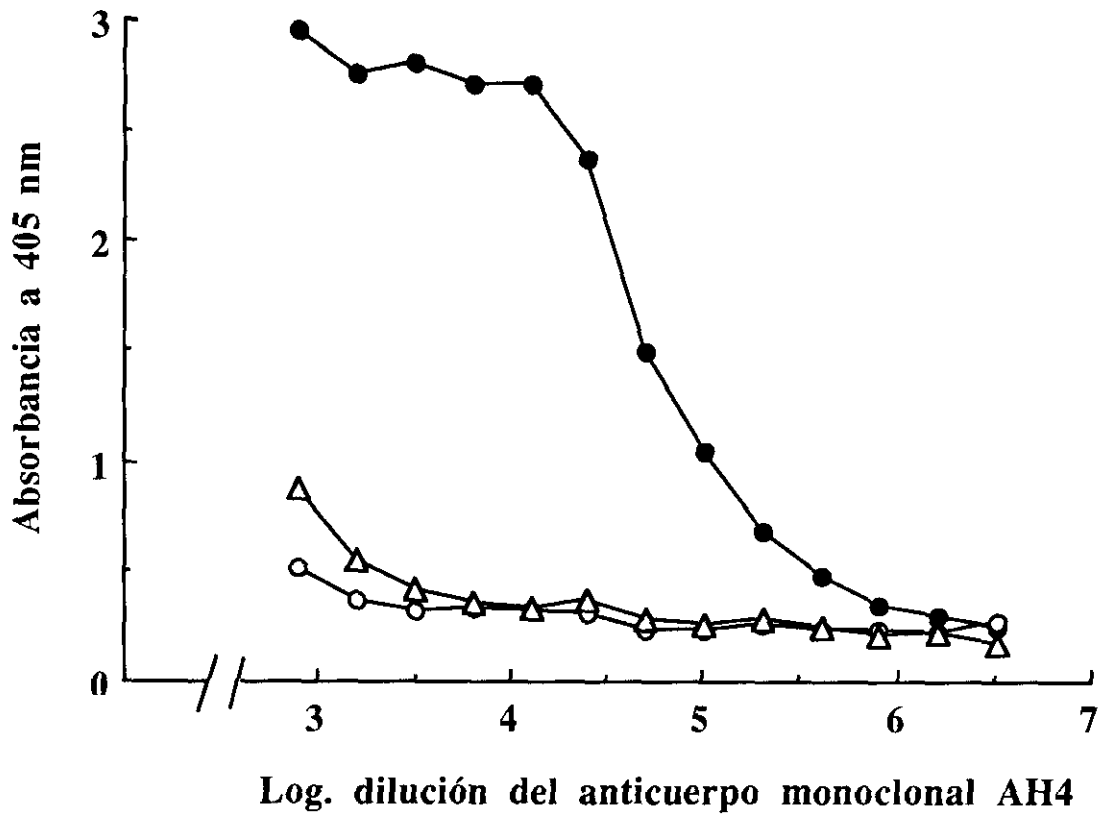


Figura IV.8. Estimación de la capacidad del anticuerpo monoclonal AH4 para reconocer las caseínas de la leche de (●) vaca, (○) oveja y (Δ) cabra. El conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa, se diluyó a la 1:2000.

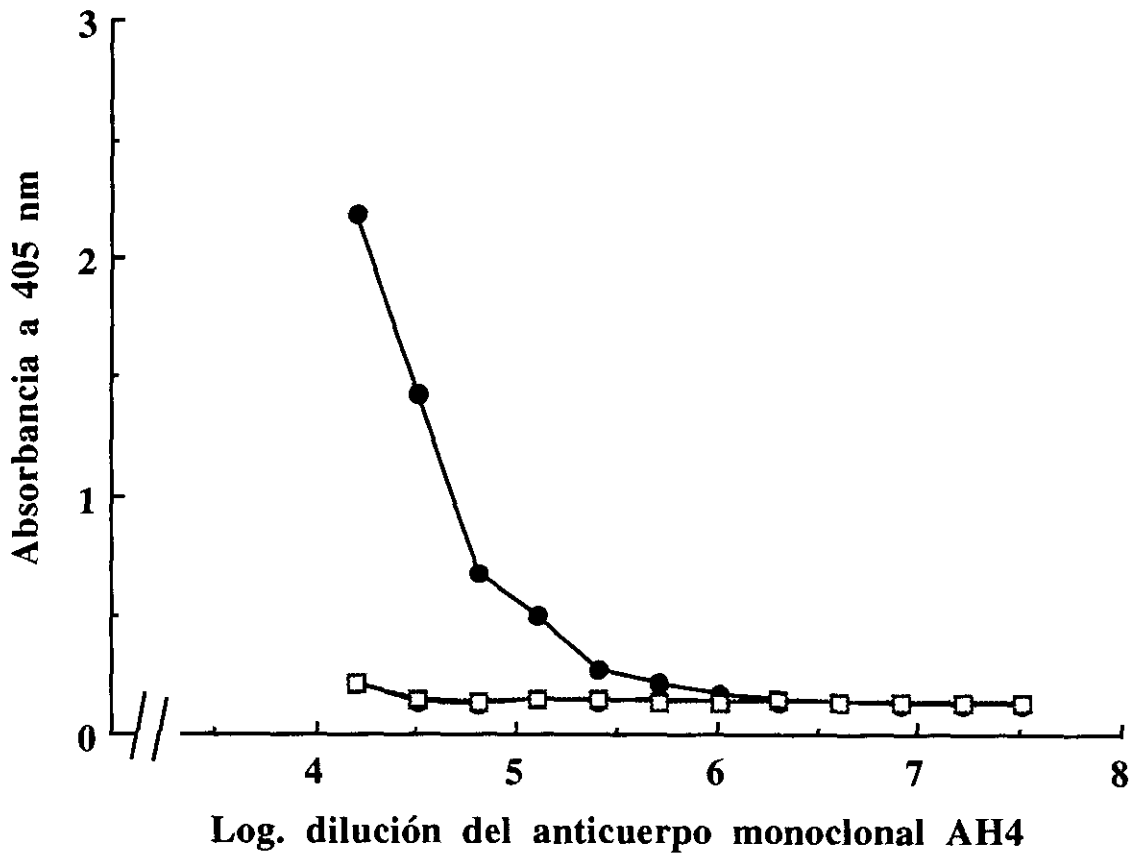


Figura IV.9. Estimación de la capacidad del anticuerpo monoclonal AH4 para diferenciar la leche cruda de vaca (●) de las leches de oveja (○) y cabra (□) mediante la técnica del ELISA indirecto. Las placas se sensibilizaron con leche fresca de vaca, oveja y cabra diluida 1:50. El conjugado comercial anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa, se diluyó a la 1:2000.

Una vez confirmada la capacidad del anticuerpo monoclonal AH4 para diferenciar la leche cruda de vaca de las leches de oveja y cabra, se procedió a cuantificar su incorporación en mezclas lácteas mediante la técnica del ELISA indirecto. Para ello, se preparó una mezcla de leches de vaca y oveja y otra mezcla de leches de vaca y cabra. Cada mezcla, se elaboró añadiendo a las leches de oveja y cabra, cantidades crecientes de leches de vaca de distintas procedencias.

Después de realizar numerosos ensayos preliminares, se determinaron las condiciones óptimas del inmunoensayo para detectar y cuantificar la leche de vaca añadida a las leches de oveja y cabra, en el intervalo del 0 al 10 % de incorporación (v/v). Los pocillos de las placas de ELISA se sensibilizaron con las mezclas de leches diluidas a la 1:25 (v/v). A continuación, se añadieron los anticuerpos monoclonales (20 mg/ml) diluidos 1:4000 y el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas a la peroxidasa, diluido 1:2000.

La ecuación de la recta (Figura IV.10.), que relacionaba los valores de absorbancia con el porcentaje de leche de vaca (% V) añadida a la leche de oveja, fue la siguiente:

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,089 + 0,111 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de leche de vaca incorporado a la mezcla. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,985$, $P < 0,0001$. Debido a las variaciones que se producen en los ensayos realizados en días diferentes y entre laboratorios distintos, es aconsejable preparar muestras patrones de composición conocida y obtener los valores de absorbancia junto con los de las muestras problema. Por consiguiente, sería necesario obtener una curva de referencia resultante de medir los valores de absorbancia de muestras patrones (con un contenido de leche de vaca conocido), cada vez que se desarrolla el inmunoensayo. El coeficiente de variación (CV) de los valores de absorbancia para una muestra patrón de leche de vaca en placas de 96 pocillos, fue $< 5 \%$ para los resultados intra-ensayo y $< 10 \%$ para los resultados inter-ensayo, obtenidos por técnicos especializados en el mismo laboratorio.

Cuando la leche de vaca se incorporó a la leche de cabra, en el intervalo de adición del 0 al 10 %, los valores de absorbancia obtenidos se ajustaron mediante una regresión lineal (Figura IV.11.). La ecuación que relacionaba los valores de absorbancia con el porcentaje de leche de vaca incorporado a las mezclas (% V) fue la siguiente:

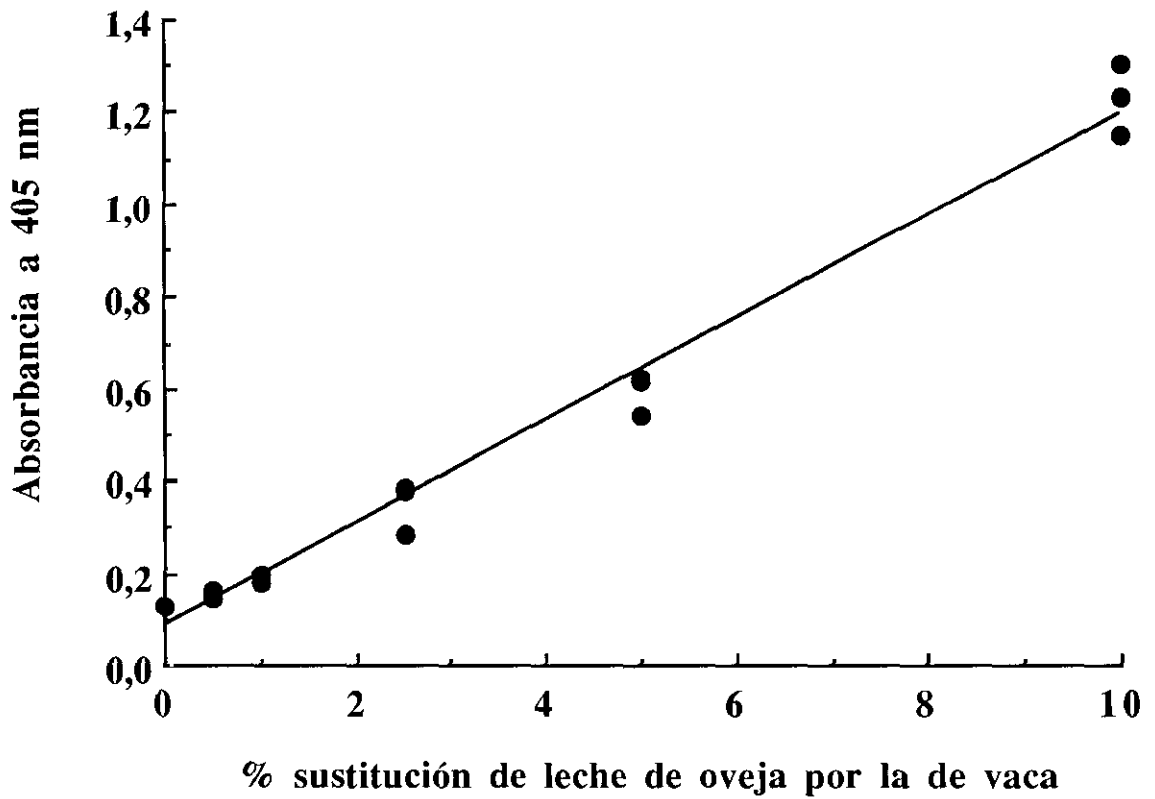


Figura IV.10. Detección de leche de vaca en leche de oveja mediante la técnica del ELISA indirecto. El anticuerpo monoclonal AH4 se diluyó 1:4000 y el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa, 1:2000. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas, con mezclas de tres procedencias diferentes.

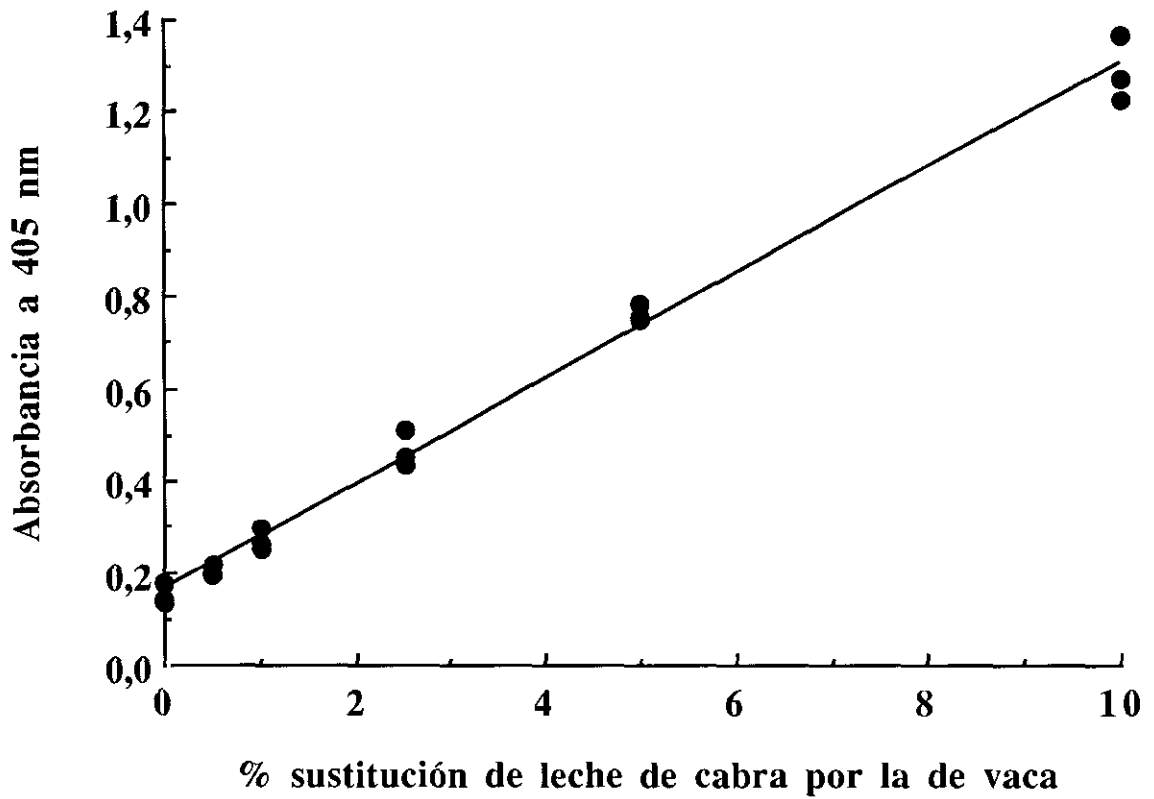


Figura IV.11. Detección de leche de vaca en leche de cabra mediante la técnica del ELISA indirecto. El anticuerpo monoclonal AH4 se diluyó 1:4000 y el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa, 1:2000. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en dos experiencias distintas, con mezclas de tres procedencias diferentes.

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,160 + 0,115 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de leche de vaca incorporado a la mezcla. El coeficiente de determinación, fue $r^2 = 0,992$, $P < 0,0001$.

IV. 5. 2. Técnica del ELISA competitivo

En la técnica del ELISA competitivo, se utilizaron las mismas muestras de leche cruda que se habían empleado en el ELISA indirecto (III.2.5.1). En esta técnica, las caseínas de vaca contenidas en las muestras que se analizan, compiten en su unión al anticuerpo con las caseínas que tapizan las placas.

La realización de numerosos ensayos preliminares, demostró que las condiciones óptimas para la detección y cuantificación de la leche de vaca añadida a las leches de oveja y cabra, se obtenían tapizando las placas de ELISA con la β -caseína comercial, a una concentración de 10 μg por pocillo. A continuación, se añadieron las muestras de leche cruda diluidas 1:25 en un tampón PBS. Seguidamente, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 (20 mg/ml) diluido 1:2500 en tampón PBST y finalmente, el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con la peroxidasa, diluido 1:2000 en tampón PBST.

Los valores de inhibición obtenidos cuando la leche de vaca se adicionó a leches de oveja y cabra, en el intervalo del 0 al 50 %, se muestran en las Figuras IV.12. y IV.13.

El cálculo de los valores de inhibición fue el siguiente:

$$\text{Inhibición} = 100 - \text{Absorbancia},$$

$$\text{Absorbancia} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra}}{\text{Valor máximo de densidad óptica}} \times 100$$

Para obtener los valores de absorbancia, primero se calcula el valor máximo de densidad óptica. Este valor se obtiene como resultado de la reacción del anticuerpo frente a una muestra de leche pura de oveja. En esta muestra, al no contener caseínas de vaca, no se establece una competencia entre las caseínas de la muestra y las caseínas que tapizan la placa por su unión con el anticuerpo, quedando todos los epítomos de éste disponibles para reaccionar con las caseínas que tapizan la placa.

La Figura IV.12., muestra los valores de absorbancia obtenidos con 3 mezclas lácteas de oveja y vaca, para un intervalo de adición de leche de vaca

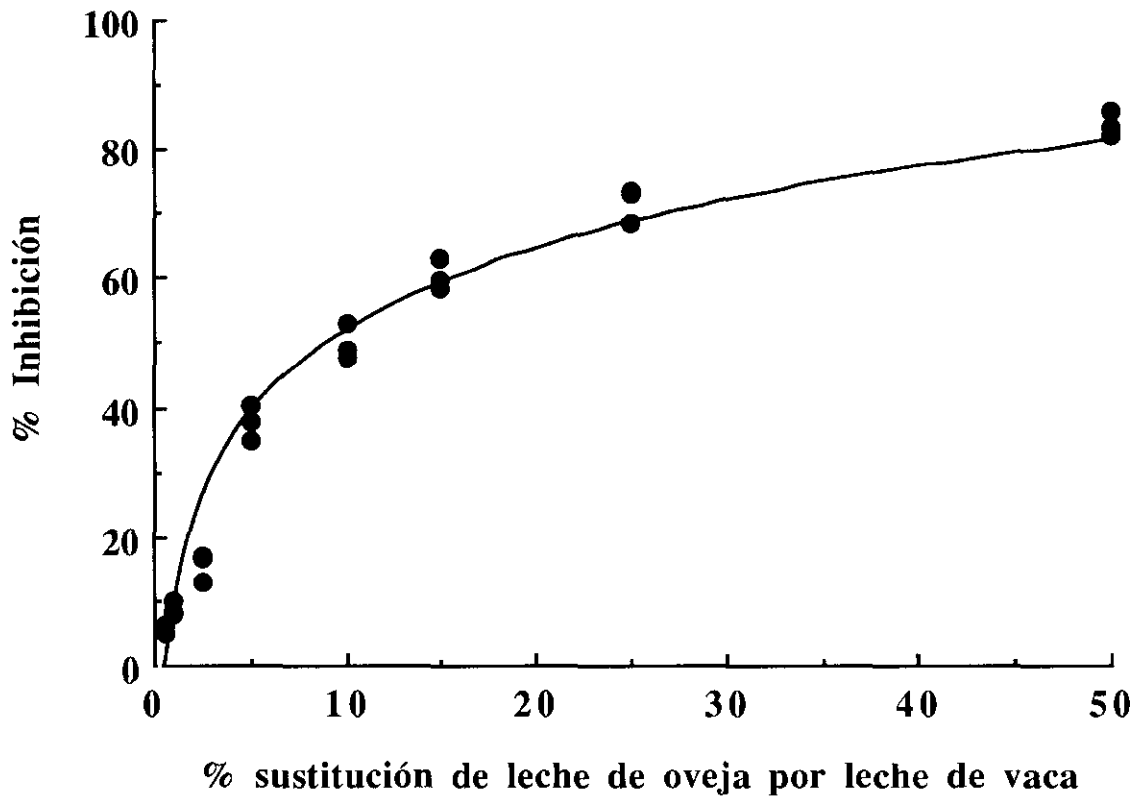


Figura IV.12. Detección de leche de vaca en oveja mediante la técnica del ELISA competitivo. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de inhibición (%) obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas, con mezclas de tres procedencias diferentes.

del 0 al 50 % (v/v). Cada punto de la gráfica representa la media de los duplicados obtenidos al repetir el ensayo en tres días distintos. El nivel de detección del ensayo fue del 0,5 % (v/v).

Los puntos de la gráfica se ajustaron por una regresión de tipo logarítmico, ajuste que tuvo como expresión la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Inhibición} = 42,05 \log (V) + 9,7976,$$

siendo V el porcentaje de leche de vaca de la mezcla. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,960$, $P < 0,0001$. Esta ecuación matemática permite, a partir de los valores de absorbancia obtenidos, cuantificar el porcentaje de incorporación de leche de vaca añadido a la leche de oveja.

En la Figura IV.13., se muestran los valores de absorbancia obtenidos con 3 mezclas lácteas de vaca y cabra, para un intervalo de adición de leche de vaca del 0 al 50 % (v/v). Cada punto de la gráfica representa la media de los duplicados obtenidos al repetir el ensayo en tres días distintos.

Los puntos de la gráfica se ajustaron por una regresión de tipo logarítmico, ajuste que tuvo como expresión la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Inhibición} = 36,846 \log (V) + 31,029,$$

siendo V el porcentaje de leche de vaca de la mezcla. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,979$, $P < 0,0001$. La ecuación matemática permite, a partir de los valores de absorbancia obtenidos, cuantificar el porcentaje de incorporación de leche de vaca añadido a la leche de cabra.

IV. 6. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA, SOMETIDA A DISTINTOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS, EN MEZCLAS LÁCTEAS POR LA TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO

Se prepararon 3 mezclas lácteas de oveja y vaca, con un intervalo de adición de leche de vaca del 0 al 50 % (v/v). La leche de vaca pasteurizada, esterilizada y UHT, se obtuvo de establecimientos comerciales (III.2.5.1).

Las placas se tapizaron con las muestras de leche diluidas a la 1:25 en un tampón PBS. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal (20 mg/ml) diluido 1:4000 en un tampón PBST y el conjugado comercial de anti-inmuno-

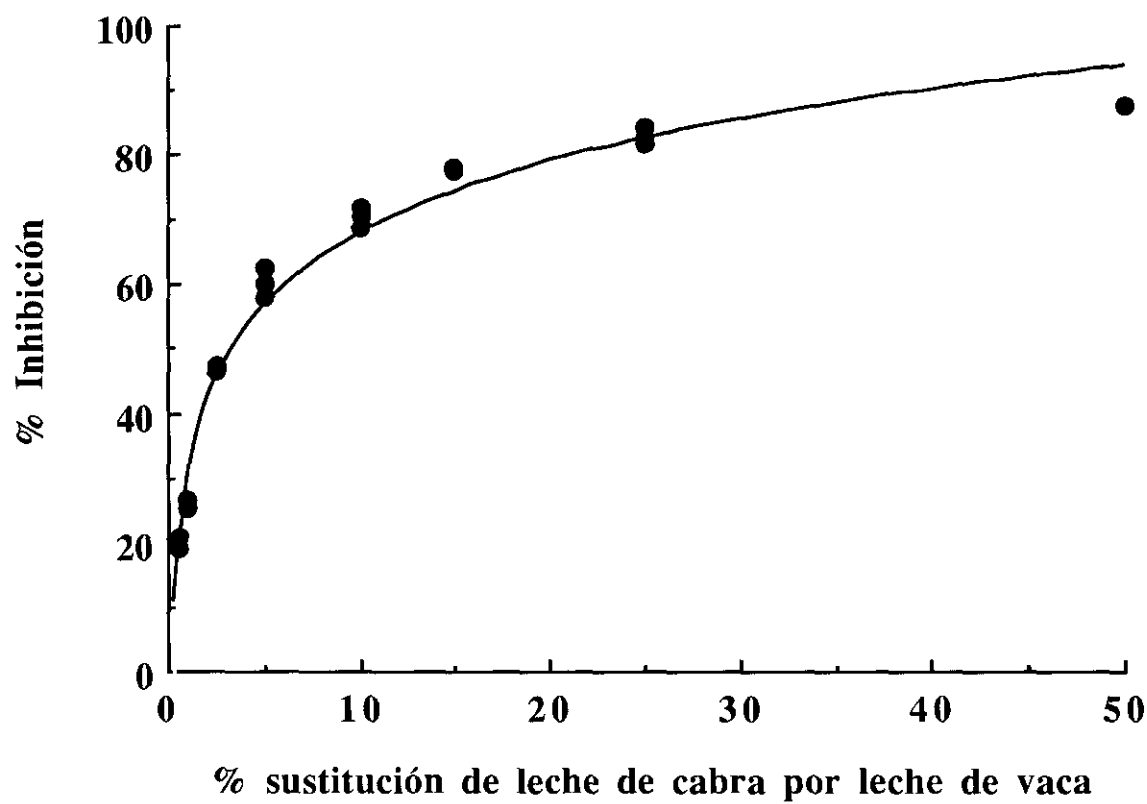


Figura IV.13. Detección de leche de vaca en cabra mediante la técnica del ELISA competitivo. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de inhibición (%) obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas, con mezclas de tres procedencias diferentes.

globulinas de ratón marcadas con peroxidasa, 1:2000.

En la Figura IV.14., se muestran los valores de absorbancia obtenidos para el intervalo de adición de leche de vaca a las mezclas del 0 al 50 % (v/v). Los resultados fueron similares a los obtenidos con las mezclas de leche cruda. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas.

Los valores de absorbancia obtenidos con las mezclas que contenían leche de vaca pasteurizada fueron ligeramente superiores (8 %) a los obtenidos con las mezclas que contenían leche de vaca cruda. Mientras que los valores de absorbancia obtenidos con las mezclas lácteas que contenían leche de vaca esterilizada y UHT fueron ligeramente inferiores (15 %) a los que se obtuvieron con las mezclas de leches crudas.

IV. 7. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN QUESOS DE OVEJA Y CABRA, POR TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)

Se emplearon las técnicas del ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA sandwich, para determinar la capacidad del anticuerpo monoclonal AH4 para detectar la leche de vaca en los quesos de oveja y cabra.

IV. 7. 1. Técnica del ELISA indirecto

Dado que carecíamos de la infraestructura necesaria para la elaboración de forma controlada de los quesos a partir de las mezclas lácteas previamente preparadas, se procedió a preparar las muestras utilizando quesos adquiridos en centros comerciales. Las mezclas de quesos se prepararon añadiendo cantidades crecientes de queso de vaca en quesos genuinos de oveja y cabra (III.2.5.1).

Después de ensayos preliminares, se determinaron las condiciones óptimas del inmunoensayo para detectar y cuantificar el % de queso de vaca presente en los quesos de oveja y cabra, en un intervalo de adición del 0 al 10 %. Las placas de ELISA se sensibilizaron con las mezclas de quesos diluidas 1:4000 (p/p) en un tampón PBS. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 (20 mg/ml) diluido 1:50.000, en un tampón PBST y finalmente, el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas a la peroxidasa diluido 1:2000.

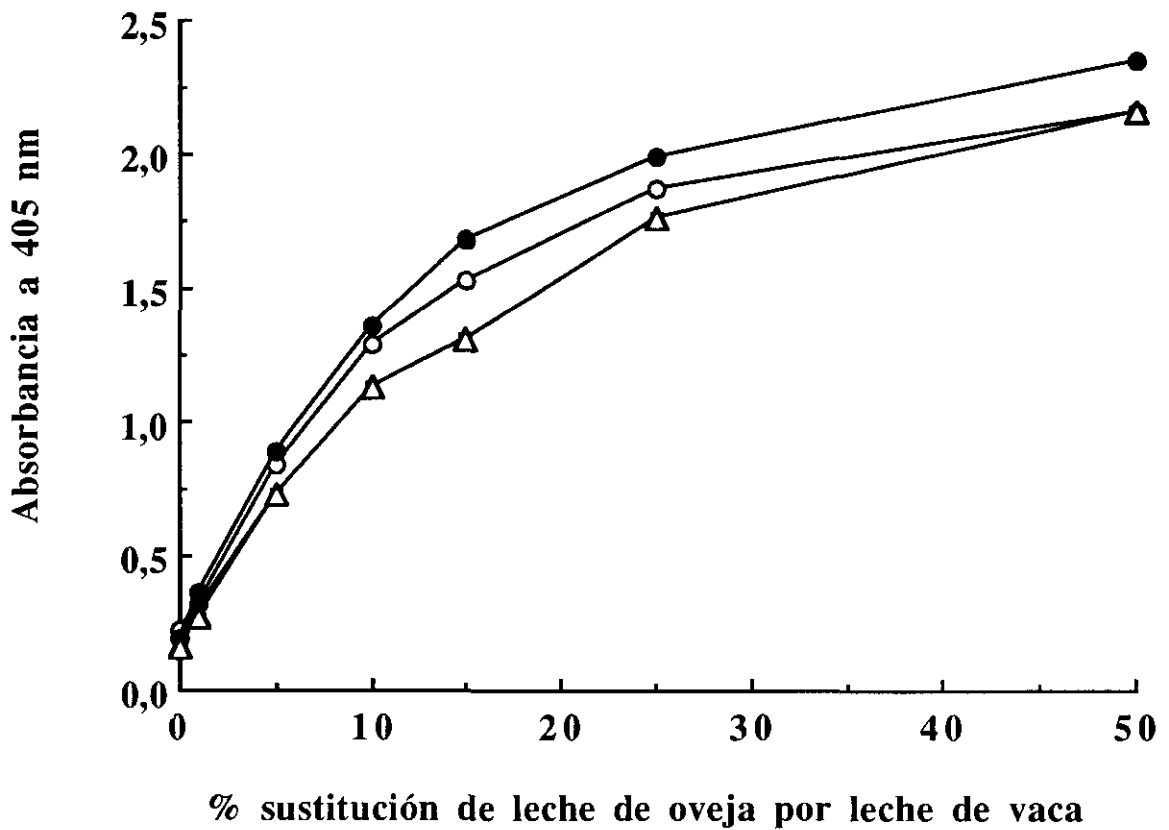


Figura IV.14. Detección de leche de vaca, sometida a diferentes tratamientos térmicos, en leche de oveja mediante la técnica del ELISA indirecto. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas. Las tres mezclas lácteas empleadas en el inmunoensayo contenían porcentajes crecientes de leche de vaca: (●) pasteurizada, (○) fresca, (Δ) esterilizada y (□) UHT.

En la Figura IV.15. se representan los valores de absorbancia obtenidos con mezclas de quesos que contenían queso de vaca en el intervalo de adición del 0 al 10 %. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado, en tres experiencias distintas utilizando mezclas de dos procedencias diferentes. Los puntos de la gráfica se ajustaron por una regresión lineal, obteniéndose la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,191 + 0,08 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de queso de vaca presente en el queso de oveja. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,983$, $P < 0,0001$. Esta ecuación matemática, permite cuantificar a partir de los valores de absorbancia obtenidos, el porcentaje de queso de vaca presente en el queso de oveja. Sin embargo, la variabilidad del ensayo que se observa en distintos días y entre diferentes laboratorios, obliga a incluir en el inmunoensayo, patrones de composición conocida junto con las muestras. El coeficiente de variación (CV) de los valores de absorbancia para una muestra patrón de queso puro de vaca en placas de 96 pocillos, fue $< 5 \%$ para los resultados intra-ensayo y $< 10 \%$ para los resultados inter-ensayo, obtenidos por técnicos especializados en el mismo laboratorio.

En la Figura IV.16., se representan los valores de absorbancia obtenidos con mezclas de quesos que contenían queso de vaca en un intervalo de adición del 0 al 10 %. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias distintas utilizando mezclas de dos procedencias diferentes. Los puntos de la gráfica se ajustaron por una regresión lineal, obteniéndose la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,138 + 0,092 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de queso de vaca presente en el queso de cabra. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,936$, $P < 0,0001$. Esta ecuación matemática permite cuantificar a partir de los valores de absorbancia, el porcentaje de queso de vaca presente en queso de cabra.

IV. 7. 2. Técnica del ELISA competitivo

Las mezclas de quesos analizados se prepararon añadiendo cantidades crecientes de queso de vaca a quesos genuinos de oveja y cabra (III.2.5.1). Después de ensayos preliminares, se determinaron las condiciones óptimas del inmunoensayo para detectar y cuantificar la incorporación de queso de vaca

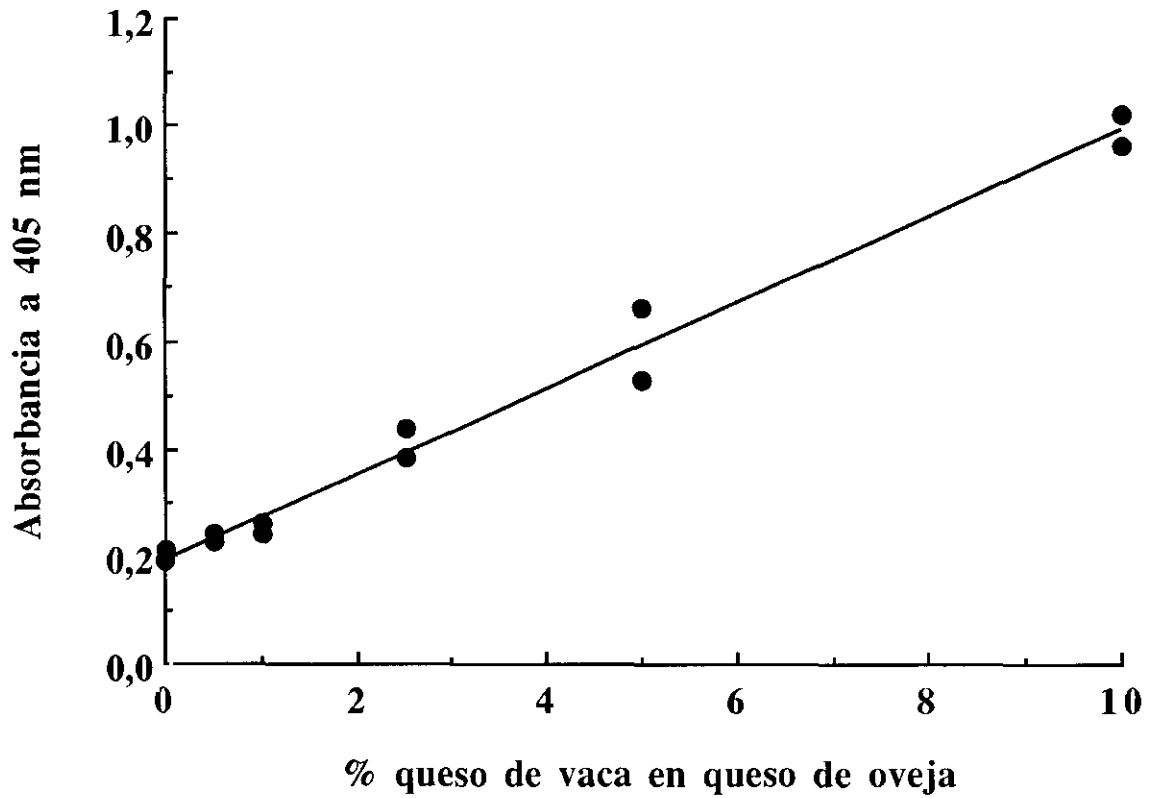


Figura IV.15. Detección de queso de vaca en queso de oveja por la técnica del ELISA indirecto. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias diferentes, con mezclas de dos procedencias distintas.

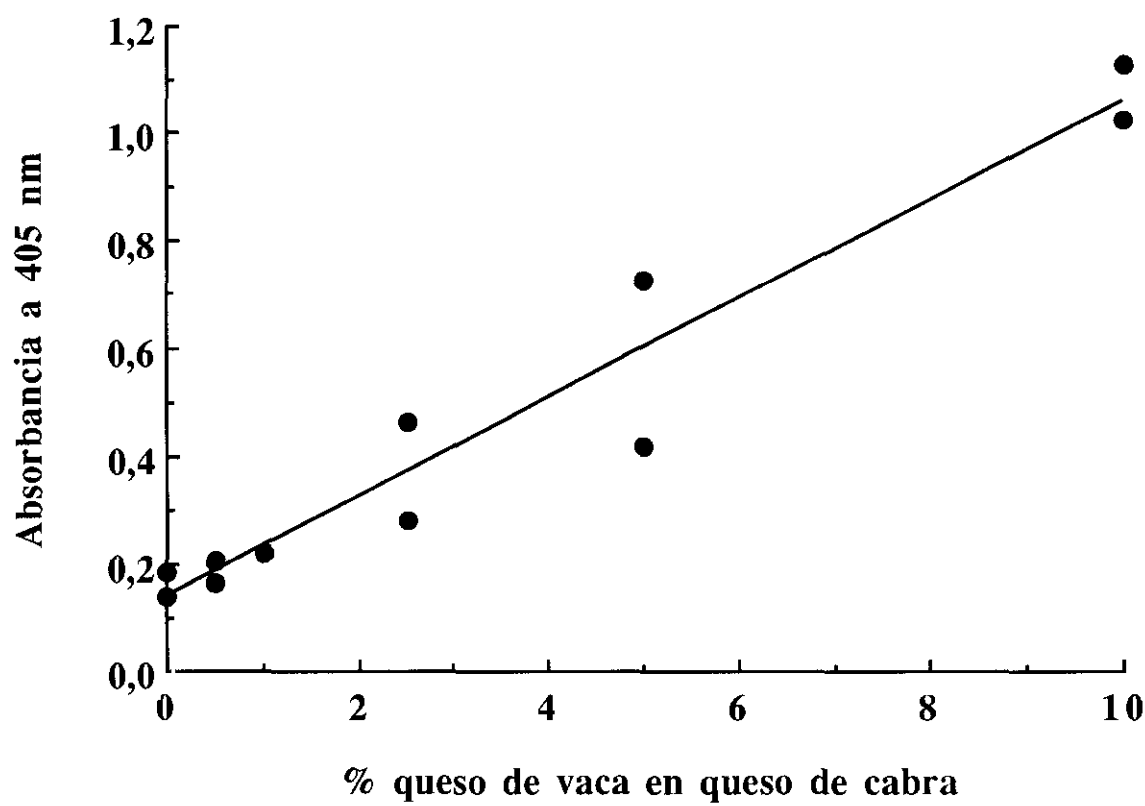


Figura IV.16. Detección de queso de vaca en queso de cabra por la técnica del ELISA indirecto. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en tres experiencias diferentes, con mezclas de dos procedencias distintas.

presente en los quesos de oveja y cabra. Las placas se sensibilizaron con la β -caseína de vaca, a una concentración de 10 μ g por pocillo. Seguidamente, se añadieron las muestras de quesos diluidas 1:500 en un tampón PBS para las mezclas de vaca en oveja y 1:200 para las mezclas de vaca en cabra. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 (20 mg/ml) diluido 1/5000, en un tampón PBST y finalmente, se añadió el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas a la peroxidasa diluido 1/2000.

En las Figuras IV.17. y IV.18., se representan los valores de inhibición obtenidos con mezclas de quesos que contenían leche de vaca en el intervalo del 0 al 50 %. La Figura IV.17., muestra los valores de inhibición que se obtuvieron con las mezclas de quesos de vaca y oveja. Cuando en los quesos genuinos de oveja había un 5 % de queso de vaca, se alcanzaban valores de inhibición del 50 %. El límite de detección de la presencia de queso de vaca en queso de oveja, fue del 0,5 % (p/p). Los valores de inhibición se ajustaron por una regresión de tipo logarítmico, obteniéndose la ecuación siguiente:

$$\text{Inhibición} = 32,52 \log (V) + 24,88,$$

siendo V el contenido de queso de vaca en queso de oveja. El coeficiente de determinación, fue $r^2 = 0,979$, $P < 0,0001$.

La Figura IV.18., muestra los valores de inhibición que se obtuvieron con las mezclas de quesos de vaca y cabra. Cuando en los quesos genuinos de cabra había un 2,5 % de queso de vaca se alcanzaban valores de inhibición del 50 %. El límite de detección de queso de vaca en queso de cabra fue del 0,5 % (p/p).

Los valores de inhibición se ajustaron por una regresión de tipo logarítmico, obteniéndose la ecuación siguiente:

$$\text{Inhibición} = 28,54 \log (V) + 40,13,$$

siendo V el contenido de queso de vaca en queso de cabra. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,927$, $P < 0,0001$. Estas ecuaciones matemáticas permiten cuantificar a partir de los valores de inhibición, el porcentaje de queso de vaca presente en quesos de oveja y cabra.

IV. 7. 3. Técnica del ELISA sandwich

Las mezclas de quesos se prepararon añadiendo cantidades crecientes de queso de vaca en quesos genuinos de oveja y cabra (III.2.5.1). Para la realiza-

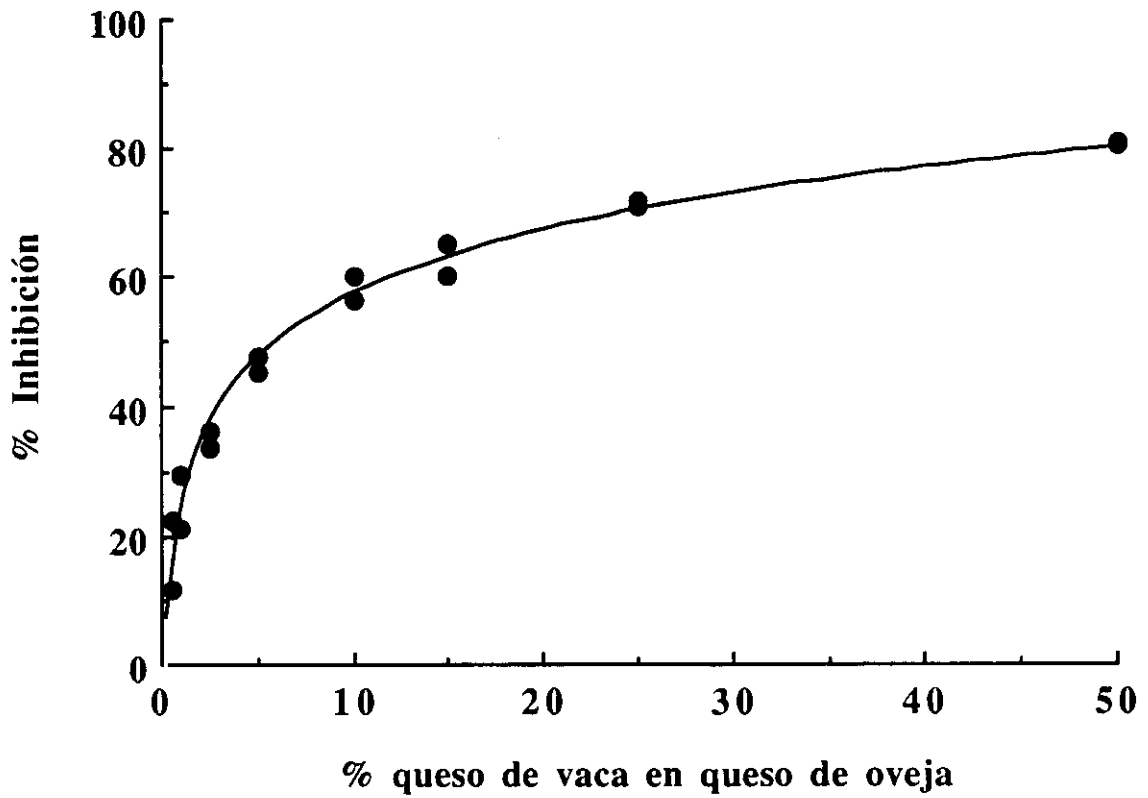


Figura IV.17. Detección de queso de vaca en queso de oveja por la técnica del ELISA competitivo. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de inhibición (%) obtenidos por duplicado en dos experiencias diferentes, con mezclas de dos procedencias distintas.

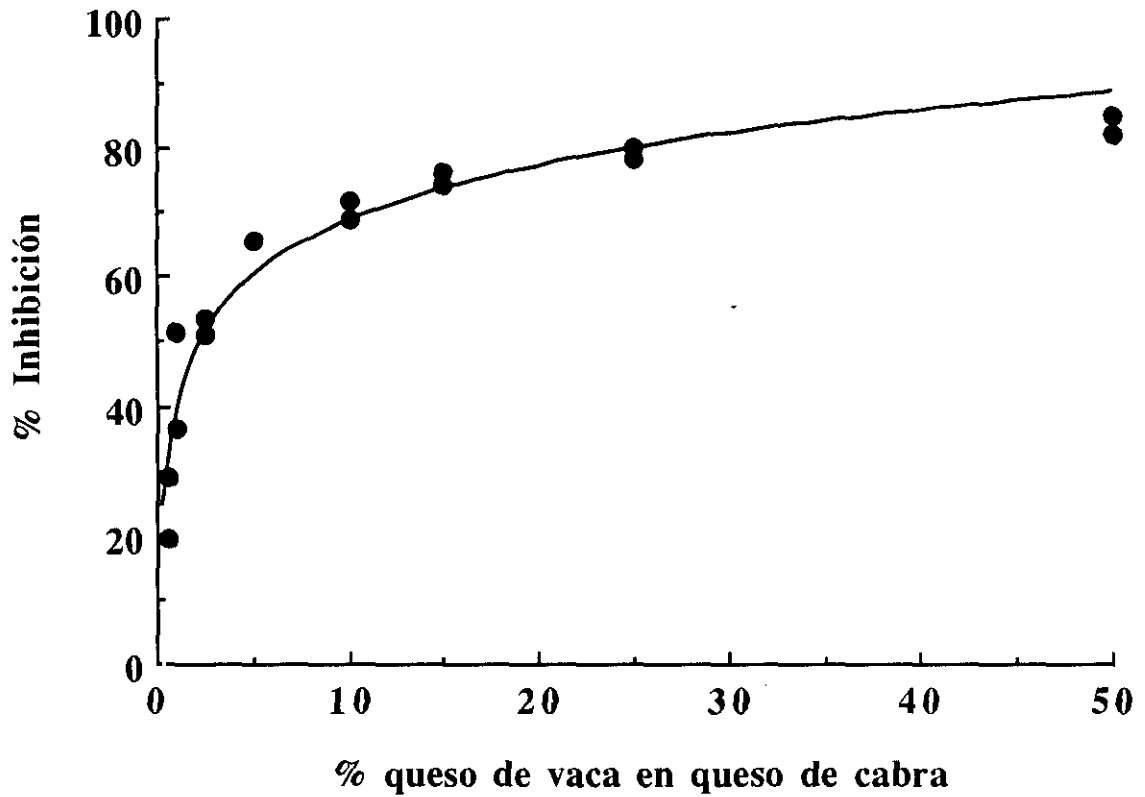


Figura IV.18. Detección de queso de vaca en queso de cabra por la técnica del ELISA competitivo. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de inhibición (%) obtenidos por duplicado en dos experiencias diferentes, con mezclas de dos procedencias distintas

ción de esta técnica, el anticuerpo monoclonal AH4 se conjugó a la digoxigenina (III.2.5.5). La detección de los anticuerpos conjugados a la digoxigenina, se efectuó con los fragmentos variables (F_{ab}) de anticuerpos anti-digoxigenina marcados con peroxidasa.

Después de ensayos preliminares, se determinaron las condiciones óptimas del inmunoensayo para detectar y cuantificar el contenido de queso de vaca presente en el intervalo del 0 al 10 %, en los quesos de oveja y cabra. Las placas se sensibilizaron con un anticuerpo policlonal de captura obtenido en conejo frente a la β -caseína de vaca, diluido 1:2500 en un tampón PBS. Seguidamente, se añadieron las mezclas de quesos diluidas 1:100 (p/p) en un tampón PBST. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 conjugado a la digoxigenina, diluido 1:100 en un tampón PBST y los fragmentos variables (F_{ab}) obtenidos frente a la digoxigenina y marcados con la peroxidasa diluidos 1:1000.

En la Figura IV.19., se representan los valores de absorbancia obtenidos con mezclas de quesos que contenían queso de vaca en el intervalo de adición del 0 al 10 %. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en dos experiencias distintas, utilizando mezclas de dos procedencias diferentes. El ajuste de los puntos de la gráfica por una regresión lineal, dió lugar a la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,271 + 0,258 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de queso de vaca en queso de oveja. El coeficiente de determinación, fue $r^2 = 0,970$, $P < 0,0001$.

Los valores de absorbancia obtenidos al analizar las mezclas de quesos de vaca y cabra, cuando éstas contenían queso de vaca en el intervalo del 0 al 10 %, aparecen en la Figura IV.20. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en dos experiencias distintas, utilizando mezclas de dos procedencias diferentes.

El ajuste de los puntos de la gráfica por una regresión lineal, dió lugar a la ecuación matemática siguiente:

$$\text{Absorbancia (405 nm)} = 0,251 + 0,269 (\% V),$$

siendo V el porcentaje de queso de vaca en queso de cabra. El coeficiente de determinación fue $r^2 = 0,995$, $P < 0,0001$. Estas ecuaciones matemáticas permiten cuantificar, a partir de los valores de absorbancia, el porcentaje de

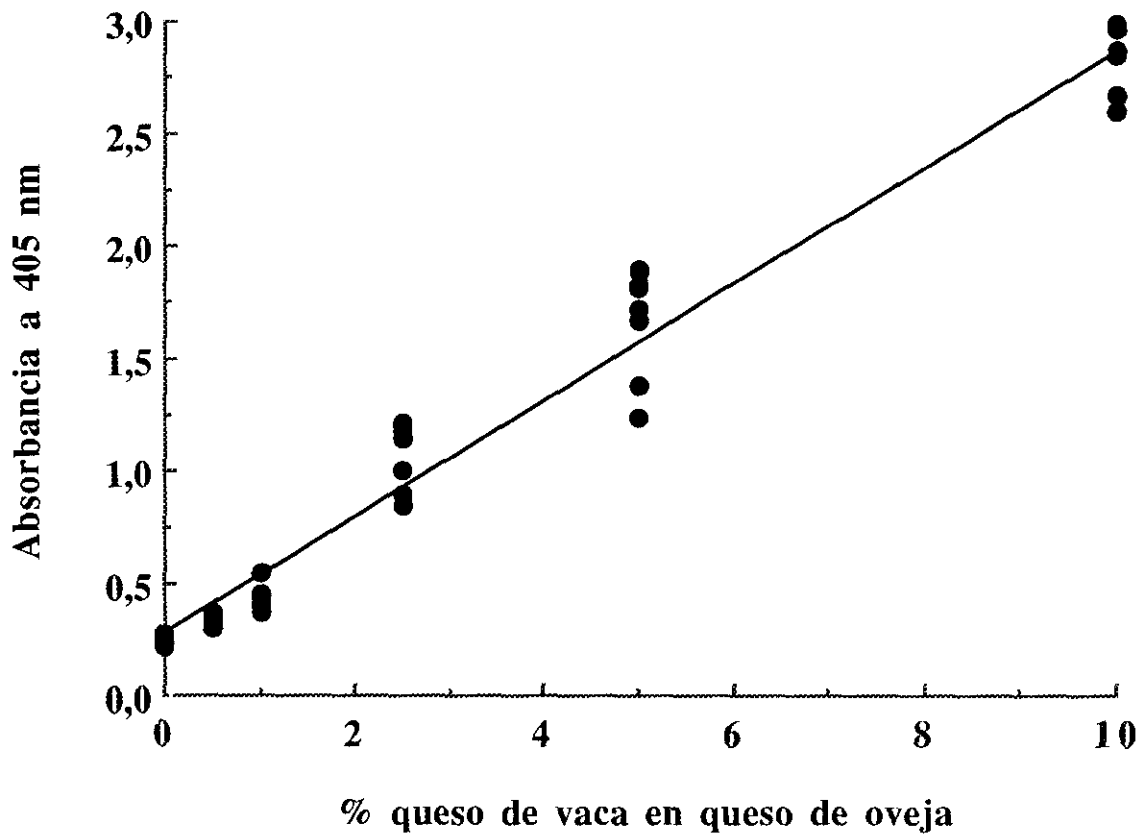


Figura IV.19. Detección de queso de vaca en queso de oveja por la técnica del ELISA sandwich. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en dos experiencias diferentes, con mezclas de dos procedencias distintas.

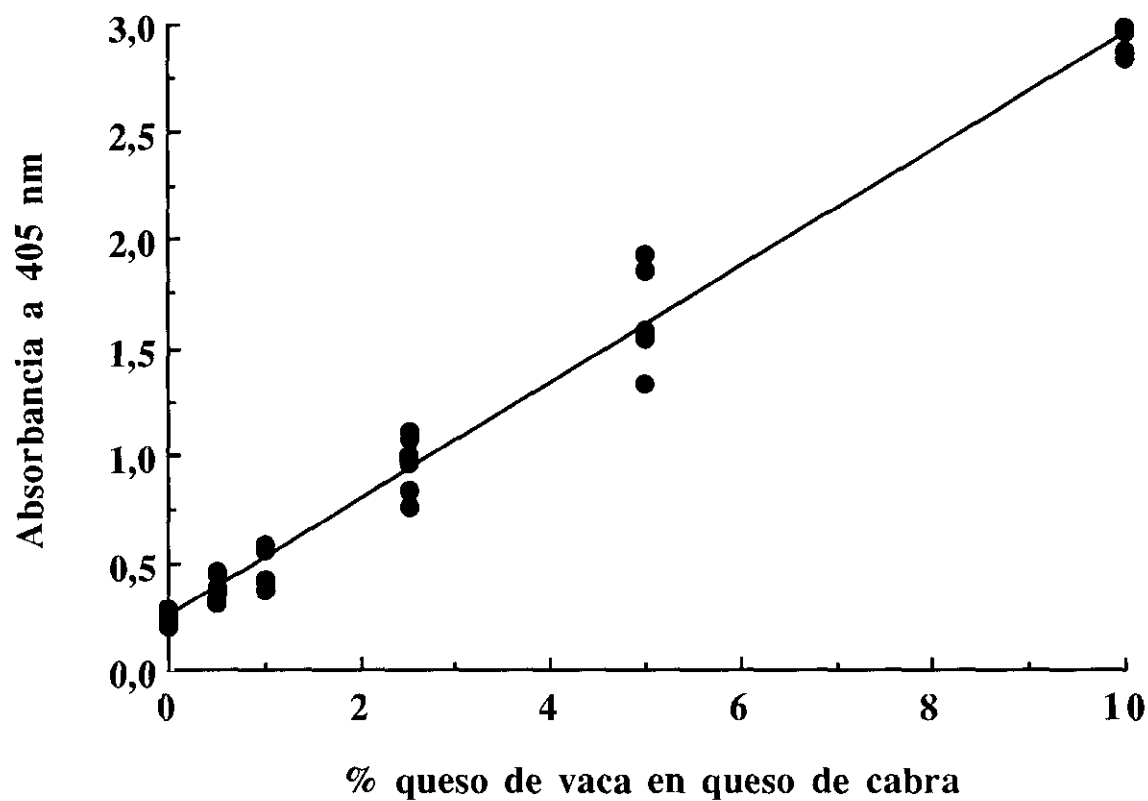


Figura IV.20. Detección de queso de vaca en queso de cabra por la técnica del ELISA sandwich. Cada punto de la gráfica representa la media de los valores de absorbancia obtenidos por duplicado en dos experiencias diferentes con mezclas de dos procedencias distintas.

queso de vaca presente en los quesos de oveja y cabra.

IV. 8. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LECHE Y QUESO DE OVEJA POR UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS

Se analizaron las mezclas de leches y quesos que se han descrito previamente (III.2.5.1). Las paletas de los criotubos se sensibilizaron con las mezclas de leches diluidas a la 1:10, en un tampón PBS. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 (20 mg/ml) diluido 1:100 en un tampón PBST. Finalmente, se añadió el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas a la peroxidasa diluido 1:1000 en un tampón PBST. Como sustrato de la reacción colorimétrica se empleó una solución de tetrametilbenzidina (TMB). Una vez transcurridos 30 minutos de incubación con el sustrato a 20°C, se añadió una solución de frenado (H_2SO_4 1M) para detener la reacción colorimétrica.

En la Figura IV.21., se muestran los resultados obtenidos en la detección de leche de vaca en leche de oveja. La reacción colorimétrica resultante de la degradación enzimática del sustrato, permitió comprobar a simple vista la diferente intensidad de color que se desarrolló entre un control negativo (leche de oveja) y las tres muestras de leche de oveja que contenían cantidades crecientes de leche de vaca (1, 5 y 25 %). Como se puede apreciar en la Figura IV.21., este ensayo permite detectar mezclas que contienen un 1 % de leche de vaca.

A continuación, se determinaron las condiciones óptimas de esta prueba rápida en paletas para utilizarla en la detección de leche de vaca en quesos de oveja. Las paletas de los criotubos se sensibilizaron con las mezclas de quesos diluidas 1:50 en un tampón PBS. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal AH4 (20 mg/ml) diluido 1:2000 en un tampón PBST. Finalmente, se añadió el conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas a la peroxidasa diluido 1:2000 en un tampón PBST. Como sustrato de la reacción colorimétrica se empleó una solución de ABTS. Una vez transcurridos 30 minutos de incubación con el sustrato a 20°C, se añadió una solución de frenado de NaF al 1 % (p/v) para detener la reacción colorimétrica.

En la Figura IV. 22., se muestran los resultados obtenidos en la detección de queso de vaca en queso de oveja. La reacción colorimétrica resultante de la degradación enzimática del sustrato, permitió comprobar visualmente la diferente intensidad de color que se había desarrollado entre un control negati-

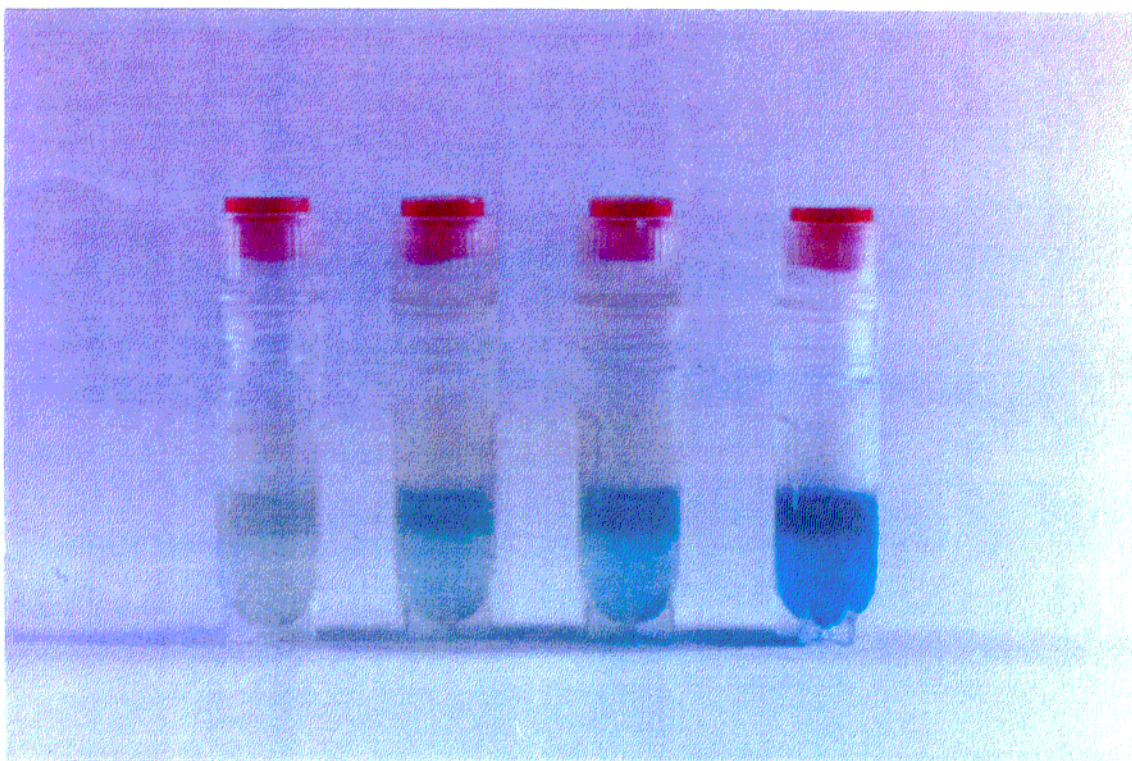


Figura IV.21. Detección de leche de vaca en leches de oveja utilizando una prueba inmunológica rápida de ELISA indirecto en paletas. (A) 0 %, (B) 1 %, (C) 5 % y (D) 25 % de leche de vaca añadida a las leches de oveja.

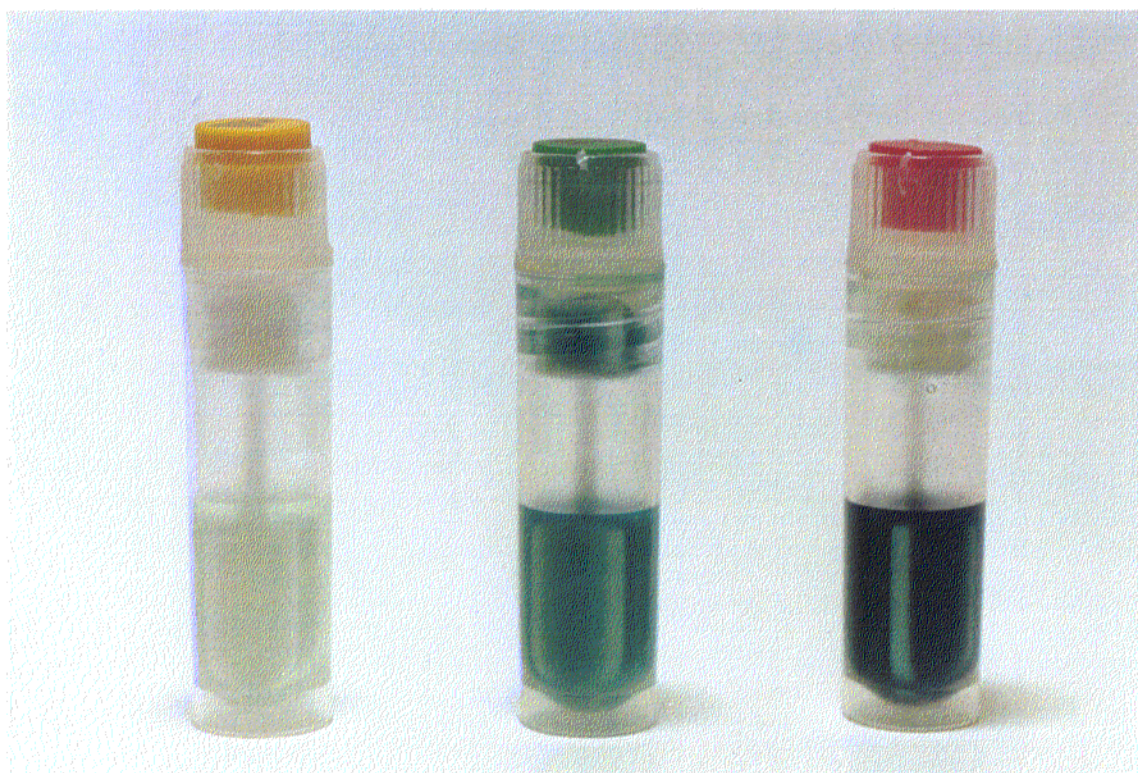


Figura IV.22. Detección de queso de vaca en quesos de oveja utilizando una prueba inmunológica rápida de ELISA indirecto en paletas. (A) 0 %, (B) 5 % y (C) 100 % de queso de vaca presente en quesos de oveja.

vo (queso puro de oveja), una muestra de queso de oveja que contenía un 5 % (p/p) de queso de vaca y un control positivo (queso puro de vaca).

En la Figura IV.23., se observan muestras de quesos de oveja que contienen cantidades crecientes (0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 25; 50 y 100 %) de queso de vaca. La reacción colorimétrica resultante de la degradación enzimática del sustrato, permitió comprobar a simple vista la diferente intensidad de color que se había desarrollado entre un control negativo (queso puro de oveja) y el resto de las muestras de quesos de oveja que contenían cantidades crecientes de queso de vaca. Como se puede apreciar en la Figura IV.23., esta prueba permite detectar mezclas que contienen un 0,5 % de queso de vaca.

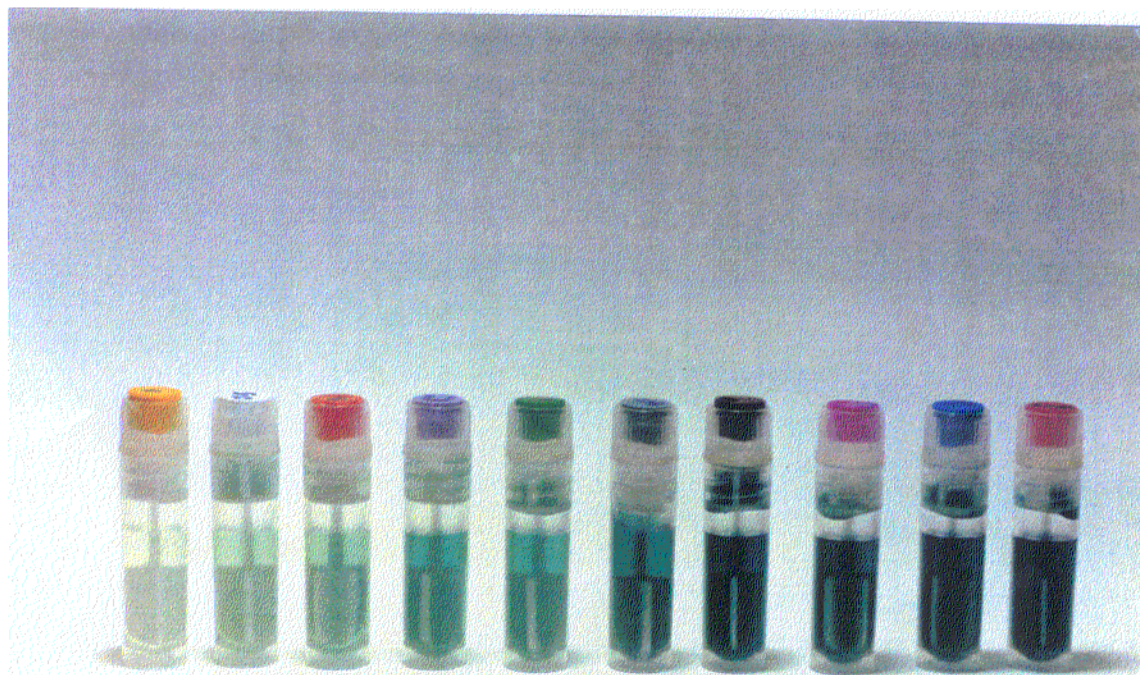


Figura IV.23. Detección de queso de vaca en quesos de oveja utilizando una prueba inmunológica rápida de ELISA indirecto en paletas. (A) 0 %, (B) 0,5 %, (C) 1 %, (D) 2,5 %, (E) 5 %, (F) 10 %, (G) 15 %, (H) 25 %, (Y) 50 % y (J) 100 % de queso de vaca presente en quesos de oveja.

DISCUSIÓN

V. 1. PURIFICACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE LA LECHE DE VACA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (FPLC)

Son varios los procedimientos químicos que pueden utilizarse para conseguir la separación de las distintas fracciones de caseína. Sin embargo, de ellos sólo las técnicas cromatográficas proporcionan fracciones homogéneas (López Fandiño, 1990).

Las primeras separaciones de caseína se realizaron por cromatografía de intercambio iónico (Swaisgood, 1993), y debido a la naturaleza anfótera de las moléculas de proteína, era posible emplear tanto intercambiadores aniónicos como catiónicos para su purificación.

Muchos autores consiguieron inicialmente aislar, identificar y cuantificar las caseínas de la leche utilizando como intercambiador iónico la DEAE-celulosa en presencia de urea (Thompson, 1966; El-Negoumy, 1975; Wei y Whitney, 1985). El empleo de urea como agente disociante en los tampones, permitía disgregar las caseínas en subunidades más pequeñas. No obstante, los intercambiadores de celulosa presentaban los inconvenientes de su baja capacidad y de que sus propiedades de flujo no eran buenas a causa de su forma irregular.

Las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC y FPLC), permitieron realizar separaciones de proteínas más rápidas y con una resolución mayor que las técnicas cromatográficas convencionales (Barrefors y col., 1985). Las técnicas de HPLC y FPLC descritas, emplean intercambiadores fuertes de mayor capacidad utilizando grupos sulfónicos (intercambiadores catiónicos) y grupos amino cuaternarios (intercambiadores aniónicos). Se han empleado tanto intercambiadores catiónicos (columna Mono S) a pH 3,8, como intercambiadores aniónicos (columna Mono-Q) en un intervalo de valores de pH de 5,0 hasta 11,0 (St-Martin y Paquin, 1990). Sin embargo, la columna Mono-Q a valores de pH entre 7,0 y 8,0, es probablemente la más efectiva para efectuar análisis rutinarios (Andrews y col., 1985).

En este trabajo, la separación de las caseínas de vaca se ha realizado siguiendo el método descrito por Davies y Law (1987). Para ello, se empleó una columna Mono Q HR 5/5 a un valor de pH 7,0. El empleo de tampones con una concentración de urea (3,3 M) inferior a la de 8 M, utilizada habitualmente por otros autores, consigue mejorar la separación entre las α_{s2} -caseínas y las α_{s1} -caseínas. Aunque en el método de Davies y Law (1987), las caseínas se alquilaban con cisteamina y cistamina, en este trabajo las caseínas

se redujeron con β -mercaptoetanol. La alquilación provoca el bloqueo de los grupos tiol de la κ -caseína y de las α_{s2} -caseínas, mientras que con el β -mercaptoetanol los grupos tiol se reducen. El pretratamiento de las caseínas tiene por objeto separar la κ -caseína y las α_{s2} -caseínas que poseen enlaces disulfuro, de la β -caseína y de las α_{s1} -caseínas, consiguiéndose con ambas técnicas resultados muy similares. A pesar de que la técnica utilizada en este trabajo no consigue separar de forma completa las α_{s2} -caseínas y las α_{s1} -caseínas (Figura IV.1.), se consideró que los resultados obtenidos eran razonablemente satisfactorios y similares a los obtenidos por otros autores (Andrews y col., 1985; Davies y Law, 1987).

Recientemente se ha descrito una técnica de HPLC por cromatografía en fase reversa, que permite la separación completa de las caseínas de cabra (Jaubert y Martin, 1992). Este método permite no sólo la separación entre las α_{s1} -caseínas y las α_{s2} -caseínas, sino que además permite identificar la mayoría de las variantes genéticas de todas las α_s -caseínas. Asimismo, estos autores señalan que esta técnica puede emplearse para el fraccionamiento de las caseínas de oveja y cabra.

V. 2. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS CASEÍNAS DE VACA PURIFICADAS POR FPLC, POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS UTILIZANDO EL APARATO PHASTSYSTEM™

La tendencia marcada de las caseínas a agregarse constituye el problema fundamental a la hora de abordar su separación (López Fandiño, 1990). Para lograr una separación electroforética efectiva de las caseínas, es necesario incorporar en el gel de electroforesis ciertos agentes que incrementan la solubilidad de las mismas y disminuyen la formación de agregados.

Entre los agentes que se pueden utilizar para solubilizar y disgregar las proteínas que van a separarse por electroforesis, se encuentran los detergentes que se incluyen tanto en la muestra como en el gel de electroforesis. En la separación electroforética que se efectuó en este trabajo, se utilizó el sodio-dodecil sulfato (SDS), siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970) mediante un aparato PhastSystem™. El SDS es un detergente aniónico que rompe las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las cadenas proteicas provocando con esta desnaturalización, la disociación de las proteínas en subunidades más pequeñas. Los complejos formados de SDS-polipéptido migran durante la electroforesis en geles que contienen SDS hacia el ánodo de acuerdo a su tamaño molecular.

La separación electroforética realizada en este trabajo (Figura IV.3.), permitió corroborar los resultados que se habían obtenido previamente en la purificación por FPLC, demostrando que las fracciones β - y κ -caseínas se habían separado a homogeneidad y confirmando que la resolución de las α -caseínas era incompleta.

En este trabajo se empleó un gel de poliacrilamida homogéneo al 12,5 %. La resolución de las proteínas en las técnicas electroforéticas es mayor cuando se emplean geles discontinuos. Sin embargo, cuando se quieren fraccionar proteínas de pesos moleculares muy próximos, está indicado el empleo de geles de poliacrilamida homogéneos. Parris y col., (1990), han descrito que la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) utilizando geles discontinuos, es una técnica eficaz para identificar las caseínas de vaca. Otros autores han descartado el uso de las electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) unidimensionales para la identificación de las caseínas de cabra (Addeo y Mauriello, 1988), aduciendo que esta técnica no permite una resolución completa de todos los componentes de la caseína. La proximidad de los tamaños moleculares y el escaso margen de diferencia en el grado de ionización de las caseínas, producirían solapamientos entre las α_{s2} -caseínas y las α_{s1} -caseínas y entre la β -caseína y otras moléculas. Muchos autores (Chianese y col., 1992, 1993) con objeto de evitar los errores que se producen con las electroforesis unidimensionales en la identificación y cuantificación densitométrica de las caseínas, han empleado electroforesis bidimensionales, combinando la primera migración electroforética en un gel de poliacrilamida (PAGE) con una técnica de isoelectroenfoque. El isoelectroenfoque permite separar las proteínas en gradientes de pH, en base a las diferencias que existen en sus puntos isoelectrónicos. Por consiguiente, la movilidad electroforética de las proteínas de la muestra en este tipo de electroforesis bidimensionales, obedece a las diferencias existentes en la carga eléctrica y en el punto isoelectrónico.

Una vez finalizada la electroforesis bidimensional, el empleo de anticuerpos policlonales específicos en las técnicas de inmunobloting, permiten identificar fracciones caseínicas con una carga eléctrica o un punto isoelectrónico muy próximos. En la actualidad, la electroforesis bidimensional combinada con el isoelectroenfoque y el inmunobloting, es probablemente la técnica de separación electroforética de las caseínas más efectiva. No obstante, la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS que se utilizó en este trabajo, resultó adecuada para caracterizar parcialmente las fracciones de caseína de vaca que se habían purificado previamente por FPLC.

V.3. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS CASEÍNAS PURIFICADAS POR FPLC UTILIZANDO TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)

La especificidad de los anticuerpos policlonales frente a un antígeno varía con la respuesta individual que presenta cada animal hacia dicho antígeno. Por tanto, para evaluar la inmunogenicidad de un antígeno pueden realizarse pruebas empíricas que consisten en inocular un extracto antigénico en un animal para determinar después la concentración de anticuerpos en el suero obtenido (Harlow y Lane, 1988).

Existen dos tipos de determinantes antigénicos en las proteínas. Los determinantes continuos son aquellos residuos aminoacídicos que se unen secuencialmente por enlaces peptídicos, mientras que los determinantes discontinuos son los residuos aminoacídicos cuya posición adyacente es consecuencia de la conformación espacial de la proteína. La localización de los determinantes antigénicos en las proteínas (Otani, 1988a) puede realizarse evaluando los cambios de la actividad inmunogénica que provocan ciertas modificaciones químicas de los residuos aminoacídicos, o bien aislando péptidos que tienen actividad inmunogénica de las proteínas originales, mediante degradación química o enzimática. Recientemente, algunos autores han sintetizado péptidos con actividad inmunogénica (Kobayashi y col., 1991).

Se han realizado numerosos estudios sobre la antigenicidad de las caseínas de la leche de vaca para localizar la actividad antigénica de la β -caseína (Otani y col., 1984a,b,c,d; 1987a; 1988b), κ -caseína (Otani y col., 1991a; 1992) y α_{s1} -caseína (Otani y col., 1985a,b; 1986a,b; 1987b; 1991b). Para ello se han obtenido fragmentos peptídicos mediante una degradación enzimática y su antigenicidad, se ha evaluado mediante técnicas de inmunoprecipitación y de ELISA empleando anticuerpos policlonales.

Los determinantes antigénicos que se encuentran tanto en la β -caseína como en la α_{s1} -caseína son principalmente de tipo continuo (Otani, 1988a; Kobayashi y col., 1991), localizándose en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Este hecho se demuestra cuando los péptidos resultantes de la degradación química o enzimática de la caseína original conservan la misma capacidad de unión al anticuerpo que la caseína intacta.

Se ha identificado un número similar de determinantes antigénicos (6:5:6) en cada una de las fracciones de la caseína de vaca (β : κ : α_{s1}). Sin embargo, cuando en este trabajo se evaluó la antigenicidad de las caseínas de vaca por medio de la técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto (Figura IV.4.), la β -caseína era la fracción que presentaba un mayor número de

epítomos reconocidos por los anticuerpos policlonales específicos anti-caseínas de vaca.

Los estudios realizados sobre la antigenicidad de las proteínas, confirman que el reconocimiento de los determinantes antigénicos o epítomos es más espacial que secuencial. Atassi (1975) y Atassi y Lee (1978) determinaron que en las proteínas globulares, los lugares de unión a los anticuerpos eran ricos en aminoácidos que contenían radicales polares (lisina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico). A partir de estos estudios, otros autores (Hopp y Woods, 1981) han establecido que la presencia de aminoácidos polares en las proteínas tiene un valor predictivo para localizar las secuencias que poseen actividad antigénica. Los aminoácidos que contienen radicales polares y los residuos de prolina, son indicadores de la actividad antigénica ya que son los residuos aminoácidos que quedan mayoritariamente expuestos en la superficie de las proteínas (Harlow y Lane, 1988). Sin embargo, las secuencias polares forman enlaces iónicos intra e intermoleculares que impiden su interacción posterior con los anticuerpos. Por consiguiente, este criterio no es suficiente para predecir la actividad antigénica de las proteínas. Además, dichas predicciones se han establecido para las proteínas globulares, cuando el comportamiento en solución de las caseínas demuestra que poseen escasa estructura secundaria y que su conformación es abierta y desordenada, y no compacta como en el caso de las proteínas globulares (Sawyer, 1993).

En la actualidad, la ausencia de modelos definitivos de ordenamiento secundario y terciario de las caseínas no permite localizar, de forma puntual en la secuencia, los lugares de unión a los anticuerpos. Por tanto, no se puede establecer una correlación que permita predecir los lugares que poseen actividad antigénica a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

V. 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CASEÍNAS DE VACA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE INMUNOBLOTTING

Para identificar y caracterizar las proteínas separadas por técnicas electroforéticas se han utilizado anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales purificados por cromatografía de afinidad (Dunn, 1993).

La precipitación de las proteínas mediante el empleo de inmunoseros específicos se denomina "inmunoblotting". Cuando inicialmente se utilizaron los geles de poliacrilamida donde se habían separado las proteínas como soporte de la reacción inmunológica, los resultados no fueron satisfactorios. Se concluyó que esta dificultad se debía al pequeño tamaño de los poros del gel y en consecuencia, fue necesario transferir las proteínas separadas desde el gel de electroforesis hasta una matriz inerte, que generalmente es una membrana

de nitrocelulosa. Este procedimiento se ha empleado en este trabajo para la caracterización inmunológica de las caseínas de vaca. Una vez que las caseínas se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (0,45 μm) siguiendo la técnica descrita en el apartado III.2.5.6. Considerando que la eficacia de la transferencia depende del peso molecular de la proteína (Gershoni y Palade, 1983), se añadió un detergente (0,1 % SDS) al tampón de transferencia con el fin de facilitar la elución de las caseínas desde el gel hasta la membrana de nitrocelulosa (Erickson y col., 1982). Asimismo, se incluyó el metanol (20 %) en la formulación del tampón porque aunque resta eficacia a la transferencia de las proteínas desde el gel de electroforesis (Gershoni y Palade, 1982), aumenta la capacidad de unión de la misma a la membrana de nitrocelulosa (Burnette, 1981). Finalizada la transferencia de las proteínas y con objeto de bloquear los lugares de la membrana no ocupados por las caseínas, ésta se incubó con seroalbúmina bovina (1 %). La detección de las caseínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa se realiza utilizando un anticuerpo conjugado a una enzima, que al reaccionar con un sustrato adecuado da lugar al desarrollo de una reacción colorimétrica que permite visualizar la interacción antígeno-anticuerpo. Sin embargo, la conjugación del anticuerpo a la enzima, puede modificar las características del anticuerpo y por tanto, es conveniente utilizar un método indirecto de detección (Dunn, 1993). En este trabajo, la detección de las caseínas, se efectuó empleando anticuerpos policlonales obtenidos en cabra y que se habían purificado por cromatografía de afinidad. Los anticuerpos se detectaron a su vez por un segundo anticuerpo obtenido en conejo frente a las inmunoglobulinas de cabra y marcado con la enzima peroxidasa de rábano. La diaminobenzidina se utilizó como sustrato de la peroxidasa dando lugar a una reacción colorimétrica que permitió detectar los lugares de unión antígeno-anticuerpo.

Algunos autores (Reynolds, 1970), han descrito que el SDS desnaturaliza a los antígenos de forma irreversible en las electroforesis con geles de SDS-PAGE. El efecto desnaturalizante del SDS, limita las aplicaciones de la técnica del inmunobloting cuando se emplean anticuerpos monoclonales, ya que éstos reaccionan con un solo epítipo de la molécula antigénica, y por tanto, existe la posibilidad de que el efecto desnaturalizante que produce el detergente sobre el antígeno, impida su reacción posterior con el anticuerpo (Burnette, 1981). Por el contrario, los anticuerpos policlonales reaccionan frente a muchos epítopos de la molécula antigénica y la desnaturalización producida por el SDS no impediría su unión con el antígeno (Harlow y Lane, 1988).

A pesar de que la caracterización de los anticuerpos monoclonales está limitada por la sensibilidad de los epítopos antigénicos al SDS (Schuh y col., 1992), otros autores (Kuzmanoff y col., 1990 a,b; 1991, Leung y col., 1991;

Oudshoorn y col., 1994), determinan con efectividad la especificidad de los anticuerpos monoclonales para reconocer las caseínas y la α -lactoalbúmina de vaca separadas por SDS-PAGE electroforesis. En este trabajo, las caseínas de vaca separadas por SDS-PAGE electroforesis, se detectaron mediante la técnica de inmunobloting utilizando anticuerpos policlonales específicos frente a las caseínas totales de vaca. Los resultados obtenidos, permitieron confirmar que la β -caseína era la caseína de vaca que presentaba mayor número de epítomos reconocidos por los anticuerpos policlonales específicos anti-caseínas de vaca. Las bandas que se visualizaron en el carril de la membrana correspondiente a la κ -caseína demostraban que los anticuerpos policlonales presentaban reacciones cruzadas frente a dicha fracción de la caseína de vaca. La reacción colorimétrica correspondiente a la interacción de los anticuerpos frente a las α_s -caseínas era más débil al poseer un número menor de lugares de unión con dichos anticuerpos.

V. 5. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS FRENTE A LAS CASEÍNAS DE VACA

El protocolo de inmunización y la especie animal empleada como donante de linfocitos, son dos factores importantes para conseguir una fusión celular efectiva (Spitz, 1984). Para la obtención de anticuerpos monoclonales se inmunizaron ratones de la estirpe Balb/c, que tienen un corto período de gestación (21 días), y que alcanzan rápidamente la madurez sexual (6 semanas).

En este trabajo, se realizó la inmunización de ratones Balb/c mediante la administración intraperitoneal de un extracto liofilizado de la β -caseína de vaca. La inoculación periódica de los animales con la molécula antigénica, indujo la formación de anticuerpos policlonales. Utilizando una técnica de ELISA indirecto, los valores de absorbancia obtenidos confirmaron que la concentración de los anticuerpos en el suero se incrementó a medida que se repetía la administración del antígeno. Las inoculaciones repetidas del antígeno, no sólo producen elevadas concentraciones de los anticuerpos en el inmunosero, sino que da lugar a que se establezca una competencia entre los linfocitos B. Como resultado de esta selección, se produce la supremacía de un limitado número de clones de linfocitos productores de anticuerpos que se caracterizan por su elevada afinidad por la molécula antigénica (Harlow y Lane, 1988).

Aunque existen muchos protocolos de inmunización, no es recomendable acortar mucho los intervalos de tiempo existentes entre dos inoculaciones sucesivas, ya que esto supondría la rápida destrucción del antígeno por los

anticuerpos circulantes. Conforme a la pauta de inmunización descrita en el apartado III.2.3.1, los ratones se inmunizaron semanalmente.

Algunos autores, han desarrollado una técnica de inmunización que consiste en inocular directamente el antígeno en el bazo, con el fin de inmunizar de forma adecuada a los animales, sin necesidad de efectuar inoculaciones sucesivas del antígeno (Spitz, 1984; Gearing, 1985). Los resultados obtenidos con esta técnica de inmunización, demuestran que la concentración de anticuerpos en el suero es menor que la de los inmunosueros obtenidos en ratones inmunizados intraperitonealmente (Gearing, 1985). No obstante, los anticuerpos demuestran una mayor especificidad por el antígeno. Asimismo, el método de inmunización intraesplénica requiere la utilización de concentraciones muy pequeñas de antígeno (20 μg) para alcanzar una concentración adecuada de anticuerpos.

Actualmente, a pesar de que la inmunización de los ratones es aún esencial para la obtención de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, se han propuesto otras alternativas que recurren a las técnicas de ingeniería genética para obtener anticuerpos específicos, sin que sea necesario inmunizar animales (Winter y Milstein, 1991).

Los anticuerpos policlonales proceden de una población heterogénea de linfocitos B productores de muchos tipos de anticuerpos con afinidades y especificidades variables. La tecnología de obtención de los anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975), permitió inmortalizar “in vitro” clones de linfocitos B que producían cantidades ilimitadas de anticuerpos químicamente idénticos (Lee y Morgan, 1993). Los anticuerpos monoclonales presentan una respuesta uniforme y reproducible frente a la molécula antigénica empleada en su obtención, y por ello, tienen un gran valor en el desarrollo de ensayos diagnósticos, a los que confiere gran especificidad, reproducibilidad y sensibilidad (Pellón y Hernández, 1987). Sin embargo, la producción de anticuerpos policlonales representa un coste menor y pueden ser más adecuados para ciertas necesidades. Además, un inmunosero policlonal se puede purificar con el objeto de eliminar aquellas poblaciones de anticuerpos que disminuyen la especificidad del inmunoensayo (Lee y Morgan, 1993).

Considerando la compleja composición de los alimentos y las modificaciones moleculares que se producen durante el procesado, la selección de un antígeno adecuado es esencial para producir los anticuerpos que se utilizarán en los inmunoensayos. Así, los cambios de pH y de temperatura afectan a la conformación espacial de las proteínas, produciéndose la pérdida de algunos epítomos antigénicos y la formación de otros nuevos (Paraf, 1992).

Por ello, es necesario proceder a la extracción y purificación previa de las proteínas de interés con el objeto de producir anticuerpos frente a su conformación nativa.

Cuando se quieren detectar fraudes o adulteraciones en los alimentos sometidos a tratamientos térmicos, lo más adecuado es seleccionar antígenos termoestables (Paraf, 1992). Las proteínas séricas lácteas se desnaturalizan con los tratamientos térmicos convencionales a los que se somete la leche (Calvo y col., 1989), a diferencia de las caseínas que son termoestables y cuya inmunogenicidad no se ve afectada por los tratamientos térmicos (Rodríguez y col., 1990). Por ello, en este trabajo se seleccionó la caseína de la leche como posible inmunógeno para la obtención de anticuerpos monoclonales. Posteriormente, se aislaron e identificaron los distintos componentes de la caseína por FPLC, seleccionándose la fracción β -caseína para inmunizar un lote de ratones Balb/c, ya que los resultados que se habían obtenido previamente por las técnicas de ELISA confirmaron que ésta era la fracción de la caseína que contenía un número mayor de epítopos antigénicos específicos de la caseína de vaca. Seguidamente, la inmunización de los ratones con la fracción β -caseína seleccionada, permitió obtener un hibridoma que producía anticuerpos específicos frente a las caseínas de vaca y que no presentaban reacciones cruzadas frente a las caseínas de las leches de oveja y cabra.

En las fusiones celulares más eficaces, sólo un 1 % de las células presentes originariamente se fusionan, y sólo 1 de cada 10^5 , produce hibridomas viables (Harlow y Lane, 1988). Por tanto, no es sorprendente que como resultado de la fusión celular se obtuviera sólo un hibridoma productor de los anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de vaca. Los anticuerpos producidos por el hibridoma AH4, no presentaban reacciones cruzadas frente a las proteínas solubles musculares de la carne de vaca, cerdo, caballo y pollo, y en consecuencia, estos anticuerpos podrían emplearse en la detección de las caseínas añadidas a los productos cárnicos (Eriksson y Malmheden, 1992). Una vez determinada la especificidad del anticuerpo, el hibridoma seleccionado se clonó varias veces por la técnica de dilución límite, con el objeto de asegurar que los anticuerpos procedían de un único clon de células. Seguidamente, el anticuerpo se identificó como una Ig G₁ utilizando anticuerpos comerciales frente a las Ig G₁, Ig G_{2a}, Ig G_{2b}, Ig G₃, Ig M e Ig A y una técnica de ELISA sandwich. El hibridoma resultante de la clonación, se expandió mediante subcultivos celulares y el anticuerpo monoclonal se obtuvo a gran escala, induciendo ascitis en ratones machos Balb/c. Algunos autores (Evans y Miller, 1988), consideran que la producción de anticuerpos por ascitis en ratones es menos efectiva que su producción en bioreactores de fibra hueca. Esta técnica permite obtener de forma sencilla y a bajo coste, densidades celulares más elevadas ($> 10^8$ células/ml), concentraciones más

altas de anticuerpos en los sobrenadantes y una mayor pureza de los anticuerpos extraídos (> 85 %).

Los anticuerpos recuperados del sobrenadante de cultivo o de los líquidos ascíticos, pueden emplearse directamente en los inmunoensayos o bien pueden purificarse por precipitación selectiva con sulfato de amonio y por cromatografía de afinidad (Lee y Morgan, 1993). Generalmente no es necesario purificar los anticuerpos monoclonales, aunque cuando se van a conjugar a enzimas o se van a emplear para otros fines, es necesario una purificación parcial (Goding, 1986). Los anticuerpos producidos por el hibridoma AH4 se purificaron parcialmente por precipitación selectiva con sulfato de amonio. Este método ha sido empleado por algunos autores para purificar los anticuerpos monoclonales (Leung y col., 1991; Morales y col., 1994). Otros autores, han utilizado la cromatografía de intercambio iónico para purificar los anticuerpos monoclonales (Martín y col., 1991; Levieux y Venien, 1994), o bien la cromatografía de afinidad (Nagaune y col., 1988; García y col., 1994; Oudshoorn y col., 1994). La técnica de purificación por precipitación selectiva con sulfato de amonio, se combina en la actualidad con una precipitación previa con polietilenglicol (PEG 6000) que elimina las proteínas que quedan en los flóculos de precipitado cuando se emplea el método convencional. En este trabajo, una vez que los anticuerpos se habían precipitado con sulfato amónico, se intentó proceder a su purificación por cromatografía de afinidad, empleando una columna cromatográfica de Sepharosa 4B activada con CNBr que tenía como ligando de afinidad a las caseínas de la leche de vaca. Los anticuerpos monoclonales anti-caseína de vaca, retenidos por los antígenos ligados a la columna, se eluyeron con dietilamina a pH 11,5, siguiendo la técnica descrita por Rodríguez y col. (1990). Sin embargo, mediante una técnica de ELISA indirecto se confirmó, que los anticuerpos contenidos en el eluido de la columna habían perdido su especificidad. La elución de los anticuerpos con un tampón de pH elevado, originó probablemente una desnaturalización irreversible de los mismos, lo que explica su pérdida de especificidad (Goding, 1986).

Finalmente, la concentración de Ig G en el líquido ascítico purificado por la técnica de precipitación con sulfato de amonio se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. El resultado obtenido (20 mg/ml), permitió confirmar que la concentración del mismo estaba dentro del intervalo descrito por otros autores (Goding, 1986).

Algunos autores han obtenido anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas séricas de la leche (Kuzmanoff y col., 1990b; Levieux y Venien, 1994; Mariager y col., 1994). Otros autores han obtenido y caracterizado anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de vaca (Nagaune

y col., 1988; Feng y Cunningham-Rundles, 1989; Kuzmanoff y col., 1990a; 1991; Leung y col., 1991; Oudshoorn y col., 1994), aunque ninguno ha seleccionado anticuerpos que diferencien las caseínas procedentes de leches de especies distintas. El hibridoma AH4 produce anticuerpos capaces de reconocer específicamente a las caseínas de vaca, sin presentar reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja y cabra (Figura IV.8.). Algunos de los autores que obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de vaca (Kuzmanoff y col., 1990; 1991; Leung y col., 1991), seleccionaron hibridomas frente a los componentes aislados de la caseína (β , κ , α_{s2} y α_{s1}), y otros (Nagaune y col., 1988; Oudshoorn y col., 1994), han obtenido anticuerpos monoclonales con el fin de localizar los epítomos antigénicos de las caseínas. El objetivo de este trabajo era seleccionar un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de la leche de vaca para detectar y cuantificar la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos de oveja y cabra, utilizando para ello técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

V. 6. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA INDIRECTO

Una vez obtenidos los anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de vaca, éstas se emplearon en las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar y cuantificar la leche de vaca presente en mezclas lácteas y en quesos madurados. Para que un inmunoensayo sea efectivo, se debe elegir un método y un formato que se ajusten a las necesidades de uso. El ensayo más utilizado consiste en la unión a un soporte sólido, o bien de la muestra antigénica que se quiere cuantificar, o bien del anticuerpo que se utiliza en su detección (Rittenburg y Grothaus, 1992). El empleo de un soporte sólido presenta la ventaja de permitir la separación fácil entre los antígenos y los anticuerpos unidos por reacciones específicas y los que no interaccionan y están libres. Esta separación se consigue de forma sencilla con lavados intermedios de la placa.

Algunos autores (Levieux y Venien, 1994) afirman que de los distintos formatos de ELISA, la técnica del ELISA indirecto es la menos precisa si se compara con las técnicas del ELISA sandwich o del ELISA competitivo. La menor sensibilidad de la técnica del ELISA indirecto, se debe a la forma en que se tapiza la superficie sólida de la placa, ya que se utilizan muestras constituidas por matrices biológicas complejas, que además de contener el antígeno de interés, incluyen un alto número de otras moléculas. En las técnicas del ELISA sandwich y del ELISA competitivo para tapizar la superficie sólida de las placas, se emplean anticuerpos o antígenos de alta pureza, circunstancia que provoca una disminución de las interferencias que

afectan a la capacidad de detección del anticuerpo, y por consiguiente, mejora la reproducibilidad y especificidad del inmunoensayo.

Sin embargo, el empleo de anticuerpos altamente específicos (monoclonales o policlonales purificados por la técnica de cromatografía de afinidad), produce una disminución de las reacciones cruzadas entre los anticuerpos y otras moléculas de la muestra, hecho que permite utilizar con éxito la técnica del ELISA indirecto para la detección y cuantificación de un antígeno en una muestra problema (Harlow y Lane, 1988).

En la técnica del ELISA indirecto que se desarrolló en este trabajo con objeto de detectar y cuantificar la leche de vaca presente en mezclas lácteas y quesos madurados (IV.5.1, IV.6 y IV.7.1), los pocillos de las placas de poliestireno se tapizaron con muestras de leches y quesos diluidas en un tampón de PBS a pH 7,2. Experiencias preliminares confirmaron cuáles eran las concentraciones de las muestras idóneas para obtener una buena sensibilidad del ensayo. Con esta técnica de ELISA indirecto, se alcanzó un límite de detección del 1 % de leche de vaca en leches y quesos de oveja y cabra. No obstante, mientras las muestras de leche se emplearon diluidas a la 1:25, las de queso era preciso diluirlas a la 1:4000 (p/v).

El empleo de antígenos más diluidos en los inmunoensayos realizados para detectar la presencia de leche de vaca en quesos madurados, puede explicarse por la mayor concentración caseínica del queso y por la conformación de las micelas de caseína. En la leche, la κ -caseína está situada predominantemente en la superficie micelar (Leaver y Thomson, 1993) y su localización es un factor de estabilidad de la micela que evita que la β - y las α_s -caseínas queden expuestas a interaccionar con otras moléculas. Sin embargo, durante la fabricación del queso el cuajo produce la proteólisis de la κ -caseína (Fox, 1989), haciendo que la β - y las α_s -caseínas estén más accesibles a la unión con los anticuerpos.

Aunque existen métodos enzimáticos que mediante reacciones extensas de proteólisis eliminan la antigenicidad de las caseínas de la leche (Mahmoud y col., 1992), estudios realizados por diversos autores (Visser y de Groot-Mostert, 1977; Carretero y col., 1992), han demostrado que la fracción β -caseína es resistente a la acción proteolítica desarrollada durante el periodo madurativo de los quesos de vaca, oveja y cabra, permaneciendo su actividad intacta en un 50 % después de 6 meses de maduración. Por consiguiente, los resultados obtenidos con los ELISAs indirectos utilizados para detectar la presencia de queso de vaca en quesos de oveja y cabra con grados de maduración máximos de 4 meses, se corresponden con los resultados descritos por otros autores. Estos resultados confirman que un grado de proteólisis

moderado en los quesos, no conlleva una pérdida de antigenicidad de las caseínas.

Los resultados obtenidos en los ELISAs indirectos realizados con las muestras de leche, demuestran que los valores de absorbancia correspondientes a las mezclas de leche de vaca y cabra son ligeramente superiores a los obtenidos para las mezclas de leche de vaca y oveja. La distinta composición de la leche de vaca, oveja y cabra podría explicar estas diferencias. A pesar de la variabilidad que existe en la composición de la leche según el componente genético de cada raza u otros factores ambientales como la estacionalidad o la alimentación (Egan y col., 1981), se ha establecido que la concentración proteica de la leche de oveja es significativamente superior (5,4 %) a la de las leches de vaca y cabra (3,4 %). Por ello, en la leche de oveja la capacidad del anticuerpo para detectar las caseínas de la leche de vaca se ve disminuida con respecto a la leche de cabra, donde la concentración de proteínas y por tanto de moléculas que pueden interferir en la reacción es inferior.

Cuando se analizaron las mezclas de quesos, no se observaron diferencias significativas en los valores de absorbancia obtenidos para las mezclas de quesos de vaca y oveja con respecto a las mezclas de quesos de vaca y cabra. Este diferente comportamiento observado en los quesos con respecto a las leches podría deberse a que la leche de oveja contiene mayor cantidad de proteínas solubles que las leches de vaca y cabra (Amigo, 1989) y dado que la mayoría de las proteínas solubles se eliminan en el desuerado durante la fabricación del queso, mientras que las caseínas precipitan formando la cuajada, la capacidad del anticuerpo para detectar las caseínas de vaca en quesos de oveja no difiere significativamente de la observada en los quesos de cabra.

Los resultados que se obtuvieron en los ELISAs indirectos con mezclas lácteas que contenían leches de vaca comerciales tratadas térmicamente fueron ligeramente distintos a los observados con las leches crudas. Cuando en los inmunoensayos se utilizaban muestras que contenían leche pasteurizada, los valores de absorbancia eran ligeramente superiores (8 %) a los valores obtenidos con mezclas lácteas crudas, mientras que en los casos en que se emplearon leches esterilizadas o leches UHT, los valores de absorbancia que se obtuvieron fueron ligeramente inferiores (15 %) a los observados en mezclas que contenían leches crudas.

Algunos autores (Rollema y Brinkhuis, 1989; Leaver y Thomson, 1993) han descrito que cuando la leche se somete a tratamientos térmicos superiores a los 70°C, existen cambios irreversibles en la conformación micelar que

conducen a la pérdida de la estructura rígida de la micela. El aumento progresivo de la movilidad de la micela facilitaría las interacciones entre las caseínas y las proteínas del suero, reduciéndose la accesibilidad del anticuerpo a los determinantes antigénicos de la caseína, hecho que explica la menor inmunogenicidad de la leche esterilizada UHT. Las diferencias detectadas entre la leche esterilizada y pasteurizada se deben a que el mayor o menor grado de desnaturalización de las proteínas séricas y su asociación a las micelas de caseína está condicionado a la severidad y duración del tratamiento térmico (Leaver y Thomson, 1993).

La técnica del ELISA indirecto desarrollada durante este trabajo con el fin de detectar y cuantificar la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados, presenta ciertas ventajas con respecto a algunos métodos cromatográficos, electroforéticos e inmunológicos descritos por otros autores.

La cromatografía líquida de alta resolución como las técnicas de HPLC (Kaminarides y Anifantakis, 1993) o FPLC (Haasnoot y col., 1986) permiten detectar la incorporación de leche de vaca a las leches de otras especies, utilizando como indicador a la α_{s1} -caseína de la vaca, ya que ésta eluye posteriormente a la α_{s1} -caseína de las leches de oveja y cabra en las mismas condiciones cromatográficas. Los límites de detección de la leche de vaca en las mezclas analizadas son del orden del 1-2 %. Sin embargo, estas técnicas sólo pueden emplearse en mezclas lácteas ya que durante la maduración de los quesos, la α_{s1} -caseína se degrada rápidamente. Por consiguiente, las técnicas cromatográficas sólo pueden emplearse en los quesos de forma cualitativa en función del grado de maduración del mismo.

La cromatografía de gases (Iverson y Sheppard, 1989) se basa en la determinación de los ácidos grasos para diferenciar el origen específico de las leches o quesos, ya que los ácidos grasos de cadena corta son más abundantes en las leches de oveja y cabra que en la leche de vaca. Los límites de detección de leche de vaca en mezclas lácteas oscilan entre el 10 y el 20 %. No obstante, esta técnica no permite detectar leche de vaca en mezclas lácteas o quesos elaborados con leches desnatadas.

Las técnicas electroforéticas empleadas en la detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos de oveja y cabra se basan en la determinación de las fracciones de la caseína (Ramos y col., 1977; Moio y col., 1992) o de las proteínas del suero (Amigo y col., 1992) en geles de electroforesis. El límite de detección de la leche de vaca en mezclas lácteas es aproximadamente del 5 %. En los quesos, los perfiles electroforéticos son complejos y por tanto, los resultados son difíciles de interpretar.

Dentro de las técnicas inmunológicas, el ELISA indirecto desarrollado en este trabajo para detectar y cuantificar la leche de vaca añadida a las leches y quesos de oveja y cabra, mejora la sensibilidad de otros ELISAs indirectos o de tipo sandwich que emplean anticuerpos policlonales específicos frente a las proteínas del suero (García y col., 1990, 1991) o las caseínas de la leche de vaca (Rodríguez y col., 1990). Los niveles de sensibilidad alcanzados con el ELISA indirecto desarrollado en este trabajo, son comparables a los valores obtenidos por otros autores con otros ELISAs competitivos (Rolland y col., 1993) o de tipo sandwich (Sauer y col., 1991; Rodríguez y col., 1993; Levieux y Venien, 1994).

La utilización de un anticuerpo monoclonal específico en el ELISA indirecto desarrollado en este trabajo, permite alcanzar elevados niveles de especificidad y reproducibilidad. El ELISA indirecto presenta diversas ventajas con respecto a las técnicas cromatográficas y electroforéticas como es la sencillez de su realización, y el no requerir una gran especialización del operario que realiza el análisis (Hernández y col., 1994).

V. 7. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN MEZCLAS LÁCTEAS Y QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA COMPETITIVO

De los procedimientos de ELISA utilizados para la identificación de especies en mezclas lácteas y quesos madurados, el ELISA sandwich y el ELISA competitivo destacan por su especificidad y sensibilidad (Levieux y Venien, 1994).

En el ELISA competitivo desarrollado para detectar la incorporación de la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados, la placa se tapizó con una concentración conocida de β -caseína de vaca que era la molécula antigénica que se había utilizado previamente en la inmunización de ratones con el fin de obtener anticuerpos monoclonales (IV.3). La β -caseína de vaca adsorbida en los pocillos de las placas de ELISA compite en su unión al anticuerpo con la caseína de la muestra problema. Los límites de detección conseguidos con los ELISAs competitivos mejoraron los valores obtenidos con los ELISAs indirectos. Asimismo, los resultados obtenidos con los ELISAs competitivos mejoran los resultados de otros autores que emplean anticuerpos policlonales frente a las caseínas y las proteínas del suero de la leche (Rodríguez y col., 1990; García y col., 1990, 1991), y son similares a los obtenidos por Rolland y col., (1993) que utilizan anticuerpos policlonales frente a la α_{s1} -caseína de vaca.

Otros autores han obtenido anticuerpos monoclonales frente a la κ -caseína de vaca (Feng & Cunningham-Rundles, 1989; Kuzmanoff y col., 1990a), α_{s1} -caseína (Kuzmanoff y col., 1991), α_{s2} -caseína (Leung y col., 1991) y β -caseína (Nagaune y col., 1988; Kuzmanoff y col., 1991; Oudshoorn y col., 1994). Sin embargo, en ninguno de los trabajos publicados por estos autores, se emplearon los anticuerpos monoclonales obtenidos en inmunoensayos con el objeto de detectar y cuantificar la leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados, y por consiguiente, no se ha confirmado la presencia o ausencia de reacciones cruzadas entre los anticuerpos monoclonales producidos frente a las caseínas de vaca y las caseínas de oveja y cabra.

Experimentos preliminares confirmaron que para optimizar el ELISA competitivo en los quesos era necesario realizar una dilución mayor de las muestras y del anticuerpo con respecto a las leches. Este hecho puede explicarse al igual que en el caso de los ELISAs indirectos (V.6) por el mayor contenido de proteína de los quesos y por la mayor accesibilidad del anticuerpo a las caseínas del queso debido a la acción del cuajo. Estas razones explican que también se alcancen valores de inhibición similares con cantidades inferiores de leche de vaca cuando el análisis se realiza en quesos con respecto a las mezclas lácteas.

Las diferencias que se detectan en los ELISAs competitivos utilizados para detectar leche de vaca en las leches y quesos de oveja con respecto a los que se emplean para detectar leche de vaca en leches y quesos de cabra, se explican al igual que en los ELISAs indirectos (V.6) por la mayor concentración de proteína que contiene la leche de oveja (5,4 %) con respecto a las leches de vaca y cabra (3,4 %). Por tanto, a igual concentración de leche de vaca se alcanzan niveles de inhibición superiores cuando ésta se incorpora a las leches y quesos de cabra que cuando se añade a las leches y quesos de oveja. Esta diferencia se debe a que en las leches y quesos de oveja la mayor concentración de proteínas reduce la capacidad del anticuerpo para detectar las caseínas de vaca.

En los ELISAs competitivos desarrollados para detectar la leche de vaca incorporada a mezclas lácteas y quesos madurados, se obtiene buenos niveles de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, con límites de detección del 0,5 %. Asimismo la posibilidad de aplicar el inmunoensayo a las mezclas de leches tratadas térmicamente y a los quesos madurados, aporta gran versatilidad a la técnica. La sencillez de su realización y el bajo coste de cada determinación, hacen que la aplicación del ELISA competitivo desarrollado en este trabajo sea ventajosa con respecto a las técnicas cromatográficas y electroforéticas, especialmente en programas oficiales de inspección y en la

industria donde es preciso analizar un elevado número de muestras en un corto intervalo de tiempo.

V. 8. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN QUESOS MADURADOS POR LA TÉCNICA DEL ELISA SANDWICH

Como se ha descrito en el apartado III.2.5.4. en la técnica del ELISA sandwich el antígeno presente en las muestras problema es capturado por los anticuerpos adsorbidos a los pocillos de una placa de poliestireno. El antígeno capturado es detectado por un segundo anticuerpo. Por consiguiente, la especificidad de un inmunoensayo de tipo sandwich está determinada por la especificidad de los dos anticuerpos que intervienen en la reacción inmunológica (Gosling, 1990).

Entre los ensayos inmunoenzimáticos, los ELISAs de tipo sandwich y los de tipo competitivo son más específicos que los de tipo indirecto. No obstante, la utilización de los de tipo sandwich con respecto a los competitivos, presenta la ventaja de que la reacción inmunológica en los primeros, donde no se establece una relación de competencia, no depende de la afinidad del anticuerpo, como en el caso de los ELISAs de tipo competitivo (Gosling, 1990). El ELISA de tipo sandwich es para ciertos autores (Harlow y Lane, 1988), el formato más específico para detectar y cuantificar antígenos en muestras problema.

Para el desarrollo de un ELISA de tipo sandwich se requiere un antígeno que posea al menos dos determinantes antigénicos que puedan ser reconocidos simultáneamente (Gosling, 1990) y dos anticuerpos que sean capaces de unirse a los dos determinantes antigénicos, sin que éstos se solapen en la molécula antigénica (Harlow y Lane, 1988). Uno de los procedimientos más sencillos que se utilizan en el desarrollo de los ELISAs de tipo sandwich, consiste en el empleo de dos anticuerpos monoclonales para la captura y detección del antígeno (Amarasiri y Wilson, 1992). En el ELISA sandwich desarrollado en este trabajo para detectar y cuantificar la presencia de la leche de vaca en los quesos madurados de oveja y cabra, se emplearon un anticuerpo policlonal de captura obtenido en conejo frente a la β -caseína de la leche de vaca (III.2.4.) y un anticuerpo monoclonal de detección obtenido en ratones frente a la misma fracción de caseína (III.2.3.).

Se ha observado que la utilización en los ELISAs de tipo sandwich, de anticuerpos policlonales como anticuerpos de captura, produce una falta de respuesta de la reacción antígeno-anticuerpo (Amarisiri y Wilson, 1992). Según estos autores, este fenómeno se debe a que la unión de los anticuerpos policlonales al antígeno, causa cambios de conformación del mismo que

conducen a su desorción y falta de reconocimiento posterior por los anticuerpos de detección. Se ha establecido que las condiciones de desarrollo de un ELISA de tipo sandwich (tiempos de incubación, tiempos de lavado, concentraciones de los anticuerpos, etc) son esenciales para evitar estas reacciones desfavorables cuyas causas todavía se desconocen.

En el ELISA sandwich desarrollado para detectar y cuantificar la presencia de queso de vaca en quesos madurados de oveja y cabra, se utilizó un anticuerpo monoclonal de detección conjugado a la digoxigenina. Para la detección del anticuerpo monoclonal, se utilizaron los fragmentos variables F_{ab} de anticuerpos obtenidos frente a la digoxigenina. Dentro de los sistemas de detección enzimáticos, el más frecuente consiste en la conjugación de los anticuerpos a la biotina y en su detección con conjugados de estreptavidina. Sin embargo, en ciertos casos el sistema biotina-avidina produce una actividad enzimática débil y por consiguiente, los inmunoensayos presentan bajos niveles de sensibilidad y reproducibilidad (Zischler y col., 1989). Esta reducción de la actividad enzimática se explica por la tendencia de la estreptavidina a unirse de forma inespecífica a la matriz sólida donde se desarrolla la reacción inmunológica. La experiencia obtenida por algunos autores (Zischler y col., 1989) con el sistema de detección enzimático digoxigenina-antidigoxigenina, confirma que los niveles de actividad enzimática alcanzados son más satisfactorios.

Los niveles de sensibilidad alcanzados con el ELISA sandwich desarrollado en este trabajo para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en quesos madurados de oveja y cabra, son comparables a los obtenidos por otros autores (García y col., 1991; Rodríguez y col., 1993; Levieux y Venien, 1994).

V. 9. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LECHE Y QUESOS DE OVEJA POR UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA RÁPIDA DE ELISA INDIRECTO EN PALETAS

Las características principales de esta técnica inmunológica son la utilización de tubos de polipropileno en lugar de pocillos de poliestireno para el desarrollo de la reacción inmunológica y el procedimiento de lavado con agua del grifo en sustitución de los tampones de lavado (Skerritt y Hill, 1991).

Entre las técnicas inmunológicas rápidas desarrolladas para detectar el origen específico de las leches en mezclas lácteas y quesos se incluyen: la inmunoprecipitación (Pinto, 1966), la inmunodifusión en geles de agar (Durand y col., 1974), la inhibición de la hemaglutinación (Levieux, 1980) y la inmunoelectroforesis (Radford y col., 1981). Estas técnicas, mediante el

empleo de anticuerpos policlonales, permiten detectar en un corto intervalo de tiempo la incorporación fraudulenta de leches de vaca o cabra a las leches de oveja. Más recientemente, se han desarrollado las técnicas de inmunodotting (Aranda y col., 1988, 1993) que aplicadas a las leches y quesos, permiten obtener mayores niveles de sensibilidad que las técnicas de inmunoprecipitación. Aunque todas las técnicas descritas son aplicables a la identificación del origen específico de las leches en mezclas lácteas y quesos, presentan el inconveniente de requerir la utilización de reactivos de vida útil corta, de equipos más o menos costosos y de la infraestructura de un laboratorio (García y col., 1989).

La necesidad de encontrar métodos analíticos rápidos, sencillos, económicos, sensibles y aplicables para su utilización directa en centros de producción e industrias lácteas, ha impulsado en los últimos años numerosos proyectos de investigación que persiguen el desarrollo de técnicas rápidas que cumplan los objetivos trazados. La técnica del ELISA indirecto en paletas desarrollada en este trabajo para la detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos se basó en el protocolo experimental descrito por Skerritt y Hill (1991). Estos autores desarrollaron una técnica singular para detectar gluten en la dieta de los enfermos celíacos mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal. Como principales ventajas derivadas de la utilización del anticuerpo monoclonal están su elevada especificidad sin que existan reacciones cruzadas frente a caseínas de otras especies y su disponibilidad ilimitada a lo largo del tiempo. Los niveles de sensibilidad alcanzados para la detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos es del 1 %. La rapidez y la facilidad de su realización, hacen que esta técnica sea idónea para ser desarrollada en programas oficiales de inspección y en las industrias lácteas.

CONCLUSIONES

- 1.- La caracterización electroforética de las caseínas de la leche de vaca en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), demostró que las distintas fracciones: κ -, β -, α_{s2} - y α_{s1} -caseínas, aisladas por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (FPLC), se habían purificado a homogeneidad.
- 2.- La caracterización inmunológica de las distintas fracciones caseínicas purificadas por FPLC, empleando anticuerpos policlonales específicos anti-caseínas de vaca y una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto, confirmó que la fracción β -caseína era la que presentaba un mayor número de epítopos especie-específicos. La técnica de inmunobloting permitió confirmar los resultados que previamente se habían obtenido con la técnica del ELISA indirecto.
- 3.- La utilización de la fracción β -caseína de la leche de vaca, purificada por FPLC, como antígeno en la inmunización de ratones Balb/c, permitió la obtención de un hibridoma (AH4) que producía un anticuerpo monoclonal específico para las caseínas de vaca, que no presentaba reacciones cruzadas frente a las caseínas de oveja y cabra ni frente a otras proteínas analizadas.
- 4.- El anticuerpo monoclonal AH4 se utilizó en la detección y cuantificación de la leche de vaca en mezclas lácteas frescas y quesos madurados empleando la técnica del ELISA indirecto. Con esta técnica y para una incorporación de leche de vaca del 0 al 10 % en mezclas lácteas y quesos de oveja y cabra, el límite de detección conseguido fue del 1 %.
- 5.- Cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal AH4 y una técnica de ELISA indirecto, para la detección de leche de vaca sometida a distintos tratamientos térmicos, los resultados obtenidos diferían de los alcanzados con leche cruda. La incorporación de leche de vaca esterilizada o UHT en las mezclas con leche de oveja reducía en un 15 %, los valores de absorbancia que se habían obtenido con las mezclas de leche cruda. Sin embargo, la incorporación de leche de vaca pasteurizada en las mezclas con leche de oveja incrementaba en un 8 %, los valores de absorbancia obtenidos con las mezclas de leche cruda.
- 6.- El anticuerpo monoclonal AH4 también se utilizó para la detección y cuantificación de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados de oveja y cabra empleando una técnica de ELISA competitivo. Los resultados obtenidos con esta técnica confirmaron que en el intervalo del 0 al 50 % de incorporación de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos, el

límite de detección obtenido fue del 0,5 %, lo que mejoraba los valores obtenidos con la técnica del ELISA indirecto.

- 7.- Para la detección y cuantificación de leche de vaca en quesos de oveja y cabra se utilizó la técnica de ELISA sandwich. Como anticuerpos de captura se emplearon los anticuerpos policlonales específicos anti-caseínas de vaca y como anticuerpos de detección, el monoclonal AH4 conjugado a la digoxigenina. Los resultados obtenidos confirmaron que en el intervalo del 0 al 10 % de incorporación de queso de vaca en quesos de oveja y cabra, el límite de detección obtenido fue del 1 %.
- 8.- Finalmente, el anticuerpo monoclonal AH4 también se utilizó para detectar la incorporación de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos de oveja y cabra empleando una técnica de ELISA indirecto en paletas. Los resultados obtenidos con esta técnica confirmaron que sin equipamiento laboratorio y en un tiempo inferior a 1 hora, se alcanzaba un nivel de detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos próximo al 0,5 %.

TRABAJO FUTURO

Confirmando con esta línea de investigación, otro de los objetivos futuros de este trabajo es la obtención de anticuerpos recombinantes. En 1989, tres nuevas tecnologías se habían desarrollado lo suficiente para superar algunas de las limitaciones inherentes a la obtención de anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975; Köhler y col., 1976). Estos avances hacían referencia a un mejor conocimiento de la estructura y conformación de las moléculas de anticuerpos, a la puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y a una mejor comprensión sobre la biología molecular de virus y bacterias (Winter y Milstein, 1991; Chiswell y McCafferty, 1992; Nyssönen y col., 1993; Karu y col., 1994). Este progreso conjunto hizo posible la amplificación de los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos, su inserción en fagémidos y su expresión en levaduras, insectos, plantas, hongos y *Escherichia coli*. En los últimos años se han desarrollado varios sistemas de clonación y expresión, pero de ellos la utilización de fagémidos y su expresión en *E. coli* ha resultado ser una de las más interesantes, por la facilidad de seleccionar anticuerpos específicos y porque los genes que los codifican pueden secuenciarse y someterse a mutación directa en el mismo vector (Little y col., 1993).

Los anticuerpos recombinantes obtenidos por manipulación genética, presentan las siguientes ventajas (Marks y col., 1992; Lee y Morgan, 1993; Matthews y Burnie, 1994; Winter y col., 1994):

- 1.- Ofrecen la posibilidad de prescindir de la inmunización de animales de experimentación.
- 2.- El proceso de obtención es más rápido y económico que el seguido en la obtención de anticuerpos monoclonales.
- 3.- La habilidad de interaccionar con epítomos que no están accesibles a las moléculas convencionales de anticuerpos.
- 4.- Su capacidad para ser inmovilizados en soportes como paletas o inmunosensores.
- 5.- Otros grupos funcionales como péptidos, enzimas o toxinas pueden expresarse conjuntamente con los anticuerpos.
- 6.- Permiten la obtención de reactivos de afinidad y especificidad precisas, mediante la utilización de técnicas que modifican la estructura y características del lugar de unión del anticuerpo con el antígeno (Karu y col., 1994).

A partir de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la caseína β de la leche de vaca, se planteará en un futuro próximo la obtención de anticuerpos recombinantes. A grandes rasgos, el procedimiento a seguir sería el siguiente:

- 1.- Extracción del ARN de los hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales frente a la β -caseína de la leche de vaca y purificación del ARNm.
- 2.- Síntesis del ADN complementario a partir del ARN mensajero.
- 3.- Amplificación selectiva de los genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas (V_H) y ligeras (V_L) de los anticuerpos, utilizando los cebadores adecuados y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4.- Obtención de fragmentos F_v ligados en una sola cadena polipeptídica mediante un péptido de unión y que se denominan fragmentos scFv.
- 5.- Clonación de los fragmentos scFv en un fagémido.
- 6.- Introducción de los fagémidos recombinantes en células competentes de *E. coli* y selección de los clones transformados por su resistencia a la ampicilina.
- 7.- Secuenciación de los fragmentos polipeptídicos insertados en los fagémidos.
- 8.- Expresión de los fragmentos scFv de interés.
- 9.- Finalmente, utilizando diversas técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) se comprobará la capacidad de los fragmentos scFv producidos para identificar y cuantificar la presencia de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos.

BIBLIOGRAFÍA

ADDEO, F., ANELLI, G., STINGO, C., CHIANESE, L., PETRILLI, P. y SCUDIERO, A. (1984). Riconoscimento e dosaggio dell latte bovino nel formaggio "pecorino". **Il Latte** **9**, 37-44.

ADDEO, F. y MAURIELLO, R. (1988). A gel electrophoretic study of caprine casein. **Journal of Dairy Research** **55**, 413-421.

ADDEO, F., MOIO, L., CHIANESE, L. y NOTA, G. (1989). Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures in liquid milk and Mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. **Italian Journal of Food Science** **1 (3)**, 71.

ADDEO, F., NICOLAI, M. A., CHIANESE, L., MOIO, L., SPAGNA MUSSO, S., BOCCA, A. y DEL GIOVINE, L. (1995). A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting. **Milchwissenschaft** **50 (2)**, 83-85.

AKROYD, P. (1968). Separation of milk proteins. En *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Vol. II. Y. Smith (ed.), William Heinemann Medical Books Limited, London. pp: 399.

AMARASIRI, F. y WILSON, G. S. (1992). Multiple epitope interactions in the two-step sandwich immunoassay. **Journal of Immunological Methods** **151**, 67-86.

AMIGO, L. (1989). Proteínas de leche de vaca, oveja y cabra. **Alimentación, Equipos y Tecnología** **VIII (1)**, 211-221.

AMIGO, L., IBÁÑEZ, I., FERNÁNDEZ, C., SANTA-MARÍA, G. y RAMOS, M. (1989). Comparison of an electrophoretic and an immunological method for the determination of goat and cow milk in cheese. **Milchwissenschaft** **44 (4)**, 215-218.

AMIGO, L., RAMOS, M., CALHAU, L. y BARBOSA, M. (1992). Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing and immunodiffusion in determinations of cow's and goat's milk in Serra da Estrela cheeses. **Lait** **72**, 95-101.

ANDREWS, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research** **50**, 45-55.

ANDREWS, A. T., TAYLOR, M. D. y OWEN, A. J. (1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. **Journal of Chromatography** **348**, 177-185.

ANGUITA, G., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., HAZA, A. I., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. (1995). Indirect ELISA for detection of cows' milk and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine β -casein. **Journal of Dairy Research** **62**, 655-659.

ARANDA, P., ORIA, R. y CALVO, M. (1988). Deteccion of cows'milk in ewes' and cheese by an immunodotting method. **Journal of Dairy Research** **55**, 121-124.

ARANDA, P., SÁNCHEZ, L., PÉREZ, M. D., ENA, J. M., PUYOL, P., ORIA, R. y CALVO, M. (1993). Rapid immunoenzymatic method for detecting adulteration in ewe's milk. **Food Control** **4** (2), 101-104.

ASCHAFFENBURG, R. y DANCE, J. E. (1968). Detection of cows in goat's milk by gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research** **35**, 383-384.

ASSENAT, L. (1967). Contribution a l'étude d'une methode d'identification des laits et des fromages ou moyen de l'electrophorese sur gel polyacrilamide. **Lait** **47** (467), 393-414 y (468), 496-502.

ASSENAT, L. (1985). Lait de brevis. Composition et properties. En *Laits et produits laitiers de vache, brevis et chevre. Technique et documentation*. Lavoisier. APRIA. F. M. Luquet (ed.), pp: 281-319.

ATASSI, M. Z. (1975). Antigenic structure of myoglobin: the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. **Immunochemistry** **12**, 423-438.

ATASSI, M. Z. y LEE, C.- L. (1978). The precise and entire antigenic structure of native lysozyme. **Biochemical Journal** **171**, 429-434.

BARREFORS, P., EKSTRAND, B., FÄGERSTAM, L., LARSSON-RAZNIKIEWICZ, M., SCHAAR, J. y STEFFNER, P. (1985). Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. **Milchwissenschaft** **40** (5), 257-260.

BARRON, L. J. R., HIERRO, M. T. G. y SANTA-MARÍA G. (1990). HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. **Journal of Dairy Research** **57**, 517-526.

BELITZ, H. D. y GROSCH, W. (1988). Leche y productos lácteos. En *Química de los Alimentos*. Acribia, S. A., Zaragoza. pp: 405-431.

BENASSI, R. (1963). Sulla composizione del grasso di latte di pecora. **Il Latte** **36** (6), 468-470.

BITRI, L., ROLLAND, M. P. y BESANÇON, P. (1993). Immunological detection of bovine caseinomacropeptide in ovine and caprine dairy products. **Milchwissenschaft** **48**, 367-371.

BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S. y KRACHENBUHL, J. P. (1984). The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron-microscope immunocytochemistry. En *Immunolabelling for electron microscopy*. J. M. Polak and I. M. Varndell (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London. pp: 95-111.

BROOKS, D. A., BRADFORD, T. M. y HOPWOOD, J. J. (1992). An improved method for the purification of Ig G monoclonal antibodies from culture supernatants. **Journal of Immunological Methods** **115**, 129-132.

BROWN, R. J. (1988). Milk Coagulation and protein denaturation. En *Fundamentals of dairy chemistry*. Third edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. pp: 583-607.

BRUNNER, J. (1981). Cow milk proteins: twenty five years of progress. **Journal of Dairy Science** **64**, 1038-1054.

BURNETTE, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry** **112**, 195-203.

BUTLER, J. E. (1974). Immunoglobulins of the mammary secretions. En *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Vol. II. B. L. Larson y V. R. Smith (eds.), Academic Press, New York.

CALVO, M. M., AMIGO, L., OLANO, A., MARTÍN, P. J. y RAMOS, M. (1989). Effect of thermal treatments on the determination of bovine milk added to ovine or caprine milk. **Food Chemistry** **32**, 99-108.

CANCALON, P. F. (1995). Capillary Electrophoresis: A useful technique for food analysis. **Food Technology** **49** (6), 52-58.

CARRETERO, C., TRUJILLO, A-J., MOR-MUR, M., PLA, R. y GUAMIS, B. (1992). Estudio de la evolución de las caseínas durante la maduración del queso de cabra "Cendrat del Montsec". Revista Española de Lechería **48** (2), 41-43.

CARROLL, R. J. y FARRELL, H. M., Jr. (1983). Immunological approach to location of κ -casein in the casein micelle using electron microscopy. Journal of Dairy Science **66**, 679-686.

CHARRO, A., SIMAL, J., CREUS, J, M^a. y TRIGUEROS, J. (1969). Investigación de los ácidos grasos libres y combinados de los quesos mediante cromatografía gas-líquido. Anales de Bromatología **21**, 7-27.

CHEN, F-T. A. y ZANG J-H. (1992). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. Journal of AOAC International **75** (5), 905-909.

CHIANESE, L., MAURIELLO, R., MOIO, L., INTORCIA, N. y ADDEO, F. (1992). Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. Journal of Dairy Research **59**, 39-47.

CHIANESE, L., GARRO, G., NICOLAI, M. A., MAURIELLO, R., FERRANTI, P., PIZZANO, R., CAPPUCCIO, U., LAEZZA, P., ADDEO, F., RAMUNNO, L., RANDO, A. y RUBINO, R. (1993). The nature of β -casein heterogeneity in caprine milk. Lait **73**, 533-547.

CHISWELL, D. J. y McCAFFERTY, J. (1992). Phage antibodies: will new "coliclonal" antibodies replace monoclonal antibodies?. Trends in Biotechnology **10**, 80-84.

CIFUENTES, A., de FRUTOS, M. y DIEZ-MASA, J. C. (1993). Analysis of whey proteins by capillary electrophoresis using buffer-containing polyremic additives. Journal of Dairy Science **76**, 1870-1875.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. (1980). Content and composition of protein in creamery milks in South-West Scotland. Journal of Dairy Research **47**, 83-90.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. (1987). Quantitative fractionation of casein mixtures by fast protein liquid chromatography. Journal of Dairy Research **54**, 369-376.

DE FRUTOS, M., MOLINA, E. y AMIGO, L. (1996). Applicability of capillary electrophoresis to the study of bovine β -lactoglobulin polymorphism. **Milchwissenschaft** 51 (7), 374-378.

DE JONG, N., VISSER, S. y OLIEMAN, C. (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A** 652, 207-213.

DUNN, M. J. (1993). En *Gel Electrophoresis: Proteins*. J. M. Graham y D. Billington (eds.), Bios Scientific Publishers Limited, Oxford.

DURAND, M., MEUSNIER, M., DELAHAYE, J. y PRUNET, P. (1974). Detection de l'addition fraudulente de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gelosa. **Bulletin de L'Académie Vétérinaire** 47, 247-258.

EGAN, H., KIRK, R. S. y SAWYER, R. (1981). Dairy products I. En *Pearson's Chemical Analysis of Foods*. (8th ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh. pp: 433.

EIGEL, W. N., BUTLER, J. E., ERNSTROM, C. A., FARRELL, H. M., Jr., HARWALKAR, V. R., JENNESS, R. y WHITNEY, R. McL. (1984). Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fifth revision. **Journal of Dairy Science** 67, 1599-1631.

EL-NEGOUMY, A. M. (1975). Two rapid and improved techniques for chromatographic fractionation of casein. **Journal of Dairy Science** 59 (1), 153-156.

ENGVALL, E. y PERLMANN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry** 8, 871.

ERICKSON, P. F., MINIER, L. N. y LASHER, R. S. (1982). Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their reuse in immunoautoradiographic detection of antigens. **Journal of Immunological Methods** 51, 241-249.

ERICKSON, A. y MALMHEDEN, I. (1992). Quantitative analysis of casein, egg proteins, and hazelnut in food by rocket immunoelectrophoresis on Phastsystem. En *Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay systems*. M.R.A. Morgan, C. J. Smith y P. A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London. pp: 65-69.

EUBER, J. y BRUNNER, J. (1982) Interaction of κ -casein with immobilized β -lactoglobulin. **Journal of Dairy Science** 65, 2384-2387.

EVANS, T. L. y MILLER, R. A. (1988). Performance of hybridoma cell lines in large hollow fiber bioreactors. **Biotechniques** 6 (8), 762-767.

FARKYE, N. Y. y FOX, P. F. (1990). Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology** 1 (2), 37-40.

FARRELL, Jr., H. M. (1988) Physical Equilibria: Proteins. En *Fundamentals of dairy chemistry*. Third edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. pp: 461.

FENG, Z-K. y CUNNINGHAM-RUNDLES, C. (1989). Production of a monoclonal antibody to bovine κ -casein. **Hybridoma** 8: 223-30.

FIEBIG, H. J. (1985). HPLC separation of triglycerides. **Fette seifen Anstrichmittel** 87, 53-57.

FOX, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science** 72, 1379-1400.

GALANOS, O. S., KAPOULAS, V. M. y TARMARAS, E. (1976). Contribution to the study of Greek butter. **Chimika Chronika** 5, 295-301.

GALLEY, J. A. (1973). Structure of immunoglobulins. En *The Antigens*. Vol I. M. Sela (ed.), Academic Press, New York.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., HERNÁNDEZ, P. y SANZ, B. (1989). Development of a cows' milk identification test (COMIT) for field use. **Journal of Dairy Research** 56, 691-698.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., MORALES, P., HERNÁNDEZ, P. y SANZ, B. (1990). Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Dairy Science** 73, 1489-1493.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., AZCONA, J. I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. (1991). Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Food Protection** **54** (5), 366-369.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., MORALES, P., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1993). Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk. **Milchwissenschaft** **48**: 563-566.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., MORALES, P., HAZA, A. I., ANGUITA, G., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1994). Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. **Journal of the Science of Food and Agriculture** **66**, 411-415.

GARVEY, J. S., CREMER, N. E. y SUSSDORF, D. H. (1977). Electrophoresis. En *Methods in Immunology*. (3rd ed.), W. A. Benjamin, Inc. Publishers, Massachusetts. pp: 93-125.

GEARING, A. J. H., THORPE, R., SPITZ, L. y SPITZ, M. (1985). Use of "single shot" intrasplenic immunization for production of monoclonal antibodies specific for human Ig M. **Journal of Immunological Methods** **76**, 337-343.

GERSHONI, J. M. y PALADE, G. E. (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to a positively charged membrane filter. **Analytical Biochemistry** **124**, 396-405.

GERSHONI, J. M. y PALADE, G. E. (1983). Protein blotting: principles and applications. **Analytical Biochemistry** **131**, 1-15.

GODING, J. W. (1986). En *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. (2nd ed.), Academic Press Inc. Limited, London.

GOSLING, J. P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. **Clinical Chemistry** **36** (8), 1408-1427.

GOURSAUD, J. (1991). Composición y propiedades físico-químicas de la leche. En *Leche y Productos lácteos. Vaca. Oveja. Cabra*. Acribia. Luquet, F. M. (ed.), pp: 3-89.

GROSCLAUDE, F. (1988). Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéins bovines. **INRA Production Animal** **1**, 5-17.

GUIDRY, A. J., BUTLER, J. E., PEARSON, R. E. y WEINLAND, B. T. (1980). Ig A, Ig G₁, Ig G₂, Ig M, and BSA in serum and mammary secretions throughout lactation. **Veterinary Immunology & Immunopathology** 1, 329-341.

HAASNOOT, W., VENEMA, D. P. y ELENBAAS, H. L. (1986). Determination of cow milk in the milk and cheese of ewes and goats by fast protein liquid chromatography. **Milchwissenschaft** 41 (10), 642-645.

HARLOW, E. y LANE, D. (1988). *Antibodies. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

HEIL, F. y DUMONT, J. P. (1993). Caractéristiques organoleptiques de fromages de chèvre fabriqués à partir de laits contenant des variants génétiques différents de la caséine α_{s1} . **Lait** 73, 559-565.

HERNÁNDEZ, P. E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., ANGUITA, G., HAZA, A. I., GONZÁLEZ, I. y SANZ, B. (1994). Antibody-based analytical methods for meat species determination and detecting adulteration of milk. **Food & Agricultural Immunology** 6: 95-104.

HERRINGTON, B. L., SHERBON, J. W., LEDFORD, R. A. y HOUGHTON, G. E. (1972). Composition of milk in New York State. **New York's Food Life Science Bulletin** 18: 1-23.

HOLT, C. y HUKINS, D. W. L. (1991). Structural analysis of the environment of calcium ions in crystalline and amorphous calcium phosphates by x-ray absorption spectroscopy and a hypothesis concerning the biological function of the casein micelle. **International Dairy Journal** 1, 151.

HOPP, T. P. y WOODS, K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 78 (6), 3824-3828.

IVERSON, J. L. y SHEPPARD, A. J. (1989). Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. **Journal of Dairy Science** 72, 1707-1712.

JAUBERT, A. y MARTIN, P. (1992). Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. **Lait** 72, 235-247.

JENNESS, R. (1982). Inter-species comparison of milk proteins. En *Developments in Dairy Chemistry*. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers. pp: 87-114.

JENNESS, R. (1988). Composition of milk. En *Fundamentals of Dairy Chemistry*. N. P. Wong (ed.), Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. pp: 1-38.

JENNESS, R. y SLOAN, R. E. (1970). The composition of milks of various species. A review. **Dairy Science Abstracts** **32**, 599-612.

JOHNSON, M. E. (1988). Cheese Chemistry. En *Fundamentals of dairy chemistry*. Third edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. pp: 634-654.

KAMINARIDES, S. E. y ANIFANTAKIS, E. M. (1993). Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. **Journal of Dairy Research** **60**, 495-504.

KARU, A. E., SCHOLTHOF, K., ZHANG, G. Y. y BELL, W. (1994). Recombinant antibodies to small analytes and prospects for deriving them from syntethic combinatorial libraries. **Food & Agricultural Immunology** **6**, 277-286.

KINGHORN, N. M., PATERSON, G. R. y OTTER, D. E. (1996). Quantification of the major bovine whey proteins using capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A** **723**, 371-379.

KOBAYASHI, T., AMETANI, A., YAMAUCHI, K. y KAMINOGAWA, S. (1991). Differences in defining residues relevant to antibody binding by ELISA and proteolysis protection at the level of peptide antigenic determinants. **Biochimica et Biophysica Acta** **1077**, 11-18.

KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** **256**, 495-497.

KÖHLER, G., HOWE, S. C. y MILSTEIN, C. (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. **European Journal of Immunology** **6**, 292-295.

KRAUSE, Y. y BELITZ, D. Z. (1985). Differenzierung von Milchproteinen verschiedener Tierarten: Nachwels von Kuhmilch in Schaf, Ziegen und Buffelmilch bzw. **Kase. Lebensmittel Chemie Gerichtl. Chemie** **39**, 33.

KRISTIANSEN, K. R., OTTE, J., ZAKORA, M. y QVIST, K. B. (1994). Capillary electrophoresis used to monitor the enzymatic hydrolysis of caseins and the fractionation of hydrolysis products. **Milchwissenschaft** **49**, 683-638.

KUMOSINSKI, T. F., BROWN, E. M. y FARRELL, Jr., H. M. (1991a). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: κ -casein. **Journal of Dairy Science** **74**, 2879.

KUMOSINSKI, T. F., BROWN, E. M. y FARRELL, Jr., H. M. (1991b). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: α_1 -casein. **Journal of Dairy Science** **74**, 2889.

KUZDZAL-SAVOIE, S. y KUZDZAL, W. (1970). Application à l'étude des acides gras mineurs gas chromatographie en phase gazeuse a quelques problèmes de controlé. **Technique laitière** **680**, 13-19.

KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J. W. y BEATTIE, C. W. (1990a). Isolation of monoclonal antibodies monoespecific for bovine κ -casein. **Journal of Dairy Science** **73**, 2741-2748.

KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J. W. y BEATTIE, C. W. (1990b). Isolation of monoclonal antibodies monoespecific for bovine α -lactalbumin. **Journal of Dairy Science** **73**, 3077-3083.

KUZMANOFF, K. M., ANDRESEN, J. W. y BEATTIE, C. W. (1991). Isolation and characterization of monoclonal antibodies monoespecific for bovine α -casein and β -casein. **Journal of Dairy Science** **74**, 803-810.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.

LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. **Methods of Enzymology** **3**, 447-454.

LAW, A. J. R., HORNE, D. S., BANKS, J. M. y LEAVER, J. (1994). Heat-induced changes in the whey proteins and caseins. **Milchwissenschaft** **49** (3), 125-129.

LAW, A. J. R., PAPOFF, C. M., DALGLEISH, D. G. y CAMPUS, R. L. (1992). Quantitative fractionation of ovine casein by cation-exchange FPLC. **Milchwissenschaft** **47** (5), 279-282.

LAW, A. J. R. y TZIBOULA, A. (1992). Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange FPLC. **Milchwissenschaft** **47** (9), 558-561.

LEAVER, J. y THOMSON, G. (1993). Influence of heating and cooling on the trypsinolysis of caseins in bovine milk. **Milchwissenschaft** **48** (7), 378-382.

LEE, H. y MORGAN, M. R. A. (1993). Food immunoassays: applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. **Trends in Food Science and Technology** **4**, 129-134.

LE JAOUEN, J. C. y TOUSSAINT, G. (1993). Lait de chèvre en Europe. **Lait** **73**, 407-415.

LEUNG, C. T., KUZMANOFF, K. M. y BEATTIE, C. W. (1991). Isolation and characterization of monoclonal antibody directed against bovine α _{s2}-casein. **Journal of Dairy Science** **74**, 2872-2878.

LEVIEUX, D. (1974). Immunoglobulines bovines et brucellose. I. Purification des immunoglobulines et preparation de leurs antiserum spécifiques. **Annales de Recherche Vétérinaire** **5**, 329-342.

LEVIEUX, D. (1980). The development of a rapid and sensitive methods based on hemagglutination inhibition, for the measurement of cow milk goat milk. **Annals of Research** **11** (2), 151-156.

LEVIEUX, D. y VENIEN, A. (1994). Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. **Journal of Dairy Research** **61**, 91-99.

LITTLEFIELD, J. W. (1964). Selection of hybrides from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. **Science** **145**, 709.

LITTLE, M., FUCHS, P., BREITLING, F. y DÜBEL, S. (1993). Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? **Trends in Biotechnology** **11**, 3-5.

LÓPEZ-FANDIÑO, R. (1990). Fraccionamiento de caseínas de leche de vaca por cromatografía de intercambio iónico. **Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos** **30**, 303-315

LÓPEZ-FANDIÑO, R., MARTÍN-ALVAREZ, P. J., PUEYO, E. y RAMOS, M. (1994). Proteolysis assessment of several cheese varieties using different methods. **Milchwissenschaft** **49** (6), 315-318.

LUQUET, F. M. (1991). Composición y propiedades físico-químicas. En *Leche y productos lácteos. Vaca. Oveja. Cabra*. Ed. Acribia. pp: 3-89.

MAHMOUD, M. I., MALONE, W. T. y CORDLE, C. T. (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science** **57** (5), 1223-1229.

MARIAGER, B., MARIANNE, S., ERIKSEN, H. y BROGREN, C-H. (1994). Bovine β -lactoglobulin in hypoallergenic and ordinary infant formulas measured by an indirect competitive ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies. **Food & Agricultural Immunology** **6**, 73-83.

MARKS, J. D., GRIFFITHS, A. D., MALMQVIST, M., CLACKSON, T., BYE, J. M. y WINTER, G. (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. **Biotechnology** **10**, 779-783.

MARKWELL, M. A. K., HAAS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry** **87**, 206-210.

MARTÍN, R., WARDALE, R. J., JONES, S. J., HERNÁNDEZ, P. E. y PATTERSON, R. L. S. (1991). Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. **Meat Science** **30**, 23-31.

MARTÍN, R. (1993). Polimorphisme génétique des lactoprotéines caprines. **Lait** **73**, 511-532.

MATTHEWS, R. C. y BURNIE, J. P. (1994). Human recombinant antibodies and immunotherapy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** **9**, 1-6.

McSWEENEY, P. L. H., OLSON, N. F., FOX, P. F., HEALY A. y HOJRUP, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -caseína. **Journal of Dairy Research** **60**, 401-412.

MERCIER, J. C. y VILOTTE, J-L. (1993). Structure and function of milk protein genes. **Journal of Dairy Science** **76**, 3079-3098.

MIKKELSEN, J., HØJRUP, P. y KNUDSEN, J. (1987). Purification of goats' milk casein by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identification of α_{s1} -casein. **Journal of Dairy Research** **54**, 361-367.

MILLER, K. (1987). Food Intolerance. En *Toxicological aspects of food*. Miller, K. (ed.), Elsevier, Barking. pp: 347.

MOIO, L., SASSO, M. L., CHIANESE, L. y ADDEO, F. (1990). Rapid detection of bovine milk in ovine, caprine and water buffalo milk or cheese by gel isoelectric focusing on PhastSystem™. **Italian Journal of Food Science** **3**, 185-191.

MOIO, L., CHIANESE, L., RIVEMALE, M. y ADDEO, F. (1992). Fast detection of bovine milk in Roquefort cheese with PhastSystem™ by gel isoelectric focusing and immunoblotting. **Lait** **72**, 87-93.

MOLINA, E., FERNÁNDEZ-FOURNIER, A., DE FRUTOS, M. y RAMOS, M. (1996). Western blotting of native and denatured bovine β -lactoglobulin to detect addition of bovine milk in cheese. **Journal of Dairy Science** **79**, 191-197.

MORALES, P., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, Y., MARTÍN, R., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1994). Monoclonal antibody detection of porcine meat. **Journal of Food Protection** **57 (2)**, 146-149.

MORR, C. V. (1967). Effect of oxalate and urea on the ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. **Journal of Dairy Science** **50**, 1744-1751.

NAGAUNE, S-I., KAMINOGAWA, S., ENOMOTO, A., KOBAYASHI, T., KURISAKI, J-I. y YAMAUCHI, K. (1988). Preparation of anti-bovine β -casein monoclonal antibody and analysis of the interaction between the antibody and β -casein fragment. **Agricultural & Biological Chemistry** **52(10)**, 2577-2581.

NAKANE, P. K. y KAWAOI, A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** **22**, 1084.

NYSSÖNEN, E., PENTTILÄ, M., HARKKI, A., SALOHEIMO, A., KNOWLES, K. C. y KERÄNEN, S. (1993). Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesi*. **Biotechnology** **11**, 591-595.

O'KEEFFE, A. M., FOX, P. F. y DALY, C. (1978). Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. **Journal of Dairy Research** **45**, 465.

OTANI, H., IWASAKI, S. y TOKITA, F. (1984a). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. I. Antigenic reactivity of β -III with antiserum to β -casein. Milchwissenschaft **39** (4), 211-214.

OTANI, H., HIGASHIYAMA, S. y TOKITA, F. (1984b). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. II. Antigenic reactivity of γ_2 -casein with antiserum to β -casein. Milchwissenschaft **39** (5), 291-293.

OTANI, H., IWASAKI, S. y TOKITA, F. (1984c). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. III. Antigenic reactivity of peptide 1-93 with antiserum to β -casein. Milchwissenschaft **39** (7), 396-399.

OTANI, H., HIGASHIYAMA, S. y TOKITA, F. (1984d). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. IV. Antigenic activities of peptides obtained by cyanogen bromide cleavage of 94-209 region. Milchwissenschaft **39** (8), 469-471.

OTANI, H., TAKAYAMA, K. y TOKITA, F. (1985a). Antigenic identity of bovine α_{S1} - and α_{S1} -I-caseins. Milchwissenschaft **40** (1), 24-26.

OTANI, H., TAKAYAMA, K. y TOKITA, F. (1985b). Antigenic reactivity of α_{S1} -III-casein with antiserum to α_{S1} -casein. Milchwissenschaft **40** (2), 69-71.

OTANI, H., TAKAYAMA, K. y TOKITA, F. (1986a). Studies on the antigenicity of α_{S1} -casein. Milchwissenschaft **41** (9), 565-568.

OTANI, H., TAKAYAMA, K. y TOKITA, F. (1986b). Antigenic reactivities of fragments obtained by cyanogen bromide cleavage of bovine α_{S1} -casein toward antiserum to intact α_{S1} -casein. Agricultural & Biological Chemistry **50** (3), 607-613.

OTANI, H., MINE, Y. y HOSONO, A. (1987a). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. V. Antigenic activities of some peptides derived from residues 1-93. Milchwissenschaft **42** (8), 505-508.

OTANI, H., HORI, H. y HOSONO, A. (1987b). Antigenic reactivity of dephosphorylated α_{S1} -casein, phosphopeptide from β -casein and o-phospho-L-serine towards the antibody to native α_{S1} -casein. Agricultural & Biological Chemistry **51**(8), 2049-2054.

OTANI, H. (1988a). Antigenically reactive regions of bovine milk proteins. JARO- Japan-Agricultural-Research-Quarterly **22** (2), 135-142.

OTANI, H., MINE, Y. y HOSONO, A. (1988b). Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. VI. Antigenic activities of peptides produced by tryptic and V 8-proteolytic digestions of peptide 110-144. **Milchwissenschaft** **43** (12), 759-761.

OTANI, H., NEGORO, H. y HOSONO, A. (1991a). Studies on the antigenicity of cow κ -casein. **Milchwissenschaft** **46** (1), 23-25.

OTANI, H. y HOSONO, A. (1991b). Ig M and Ig G antibody of rabbits to cow α_{s1} -casein estimated on the basis of peptide fragments derived from α_{s1} -casein. **Milchwissenschaft** **46** (2), 95-97.

OTANI, H., MONNAL, M. y HOSONO, A. (1992). Bovine κ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. **Milchwissenschaft** **47** (8), 512-515.

OTTE, A. H. J., KRISTIANSEN, K. R., ZAKORA, M. y QVIST, K. B. (1994). Separation of individual whey proteins and measurement of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by capillary zone electrophoresis. **Netherlands Milk & Dairy Journal** **48**, 81-97.

OUDSHOORN, P., HIEMSTRA, P. y HESSING, M. (1994). Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against bovine β -casein. **International Dairy Journal** **4**, 671-678.

PALO, V. (1975). Falsification prove of sheep's cheese by cow's cheese. **International Dairy Federation** A7-DOC 3.

PARAF, A. (1992). A role for monoclonal antibodies in the analysis of food proteins. **Trends in Food Science and Technology** **3**, 263-267.

PARRIS, N., WHITE, A. E. y FARRELL, H. M. (1990). Identification of altered proteins in nonfat dry milk powder prepared from heat-treated skim milk. **Journal of Agricultural & Food Chemistry** **38** (3), 824-829.

PELLÓN, J. R. y HERNÁNDEZ, P. E. (1987). Biotecnología en el diagnóstico alimentario. **Biotecnología** **3** (5), 8-11.

PEPPER, L., HIPPEL, N. J. y GORDON, W. G. (1970). Effects of modification of ϵ -amino groups on interactions of κ - and α_{s1} -caseins. **Biochimica et Biophysica Acta** **207**, 340-346.

PETERSON, G. L. (1983). Determination of total protein. **Methods of Enzimology** 91, 95-119.

PIERRE, A. y PORTMANN, A. (1970). Emploi de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide pour mettre en évidence et doser Lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas de fromages. **Annales de Technologie Agricole** 19, 107-130.

PINTO, F. C. (1966). Serological differentiation of cow's, buffalo's, goat's and sheep's milks. **Journal of Dairy Research** 33, 129-137.

PRAGER, M. J. (1989). Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. **Association of Official Analytical Chemists** 72 (3), 418-421.

RADFORD, D. V., TCHAN, Y. T. y McPHILLIPS, J. (1981). Detection of cow's milk in goat's milk by immunoelectrophoresis. **Australian Journal of Dairy Technology** 36 (4), 144-146.

RAMOS, M. y MARTÍNEZ-CASTRO, I. (1976). Etude de la protéolyse du fromage type "Manchego" au cours de l'affinage. **Lait** 553-554, 165-176.

RAMOS, M., MARTÍNEZ-CASTRO, I. y JUÁREZ, M. (1977). Detection of cow's milk in manchego cheese. **Journal of Dairy Science** 60, 870-877.

RAMOS, M. y JUÁREZ, M. (1985). Estado actual de los métodos analíticos existentes para detectar mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. **Revista Española de Lechería** 4, 5-12.

RAMOS, M. y JUÁREZ, M. (1986). Métodos analíticos para la identificación de mezclas de leche de diferentes especies. **Revista Española de Lechería** 7, 19-31.

RECIO, I., MOLINA, E., RAMOS, M. y de FRUTOS, M. (1995). Quantitative analysis of major whey proteins by capillary electrophoresis using uncoated capillaries. **Electrophoresis** 16, 654-658.

REYNOLDS, J. A. y TANFORD, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 66 (3), 1002-1007.

RISPOLI, S., RIVEMALE, M. y SAUGUES, R. (1991). Mise en évidence et évaluation de la qualité de lait de vache dans les fromages de brebis par isoélectrofocalisation des lactosérums. Application au cas de fromages très protéolysés: fromages type Roquefort. **Lait** **71**, 501-510.

RITTENBURG, J. H. y GROTHAUS, G. D. (1992). Immunoassays: formats and applications. En *Food Safety and Quality Assurance: Applications of Immunoassay systems*. M. R. A. Morgan, C. J. Smith y P. A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, London. pp: 3-10.

RODRÍGUEZ, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P. E. y SANZ, B. (1990). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Dairy Research** **57**, 197-205.

RODRÍGUEZ, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., MORALES, P., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1993). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of the Science of Food & Agriculture** **61**, 175-180.

ROLLAND M.-P., BITRI, L. y BESANÇON, P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α ₁-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. **Journal of Dairy Research** **60**, 413-420.

ROLLAND M.-P., BITRI, L. y BESANÇON, P. (1995). Monospecificity of the antibodies to bovine α ₁-casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. **Journal of Dairy Research** **62**, 83-88.

ROLLEMA, H. S. y BRINKHUIS, J. A. (1989). A H-NMR study of bovine casein micelles; influence of pH, temperature and calcium ions on micellar structure. **Journal of Dairy Research** **56**, 417-425.

SADINI, V. (1963). Contributto alla conoscenza della materia grassa del latte e dei formaggi di pecora italiani. **Il Latte** **37**, 933-942.

SAUER, VON S., DIETRICH, R., SCHNEIDER, E. y TERPLAN, G. (1991). [Development of an immunoassay to detect cow's milk in ewe's and goat's milk]. **Archiv für Lebensmittelhygiene** **42**, 133-160.

SAWYER, L. y HOLT, C. (1993). The secondary structure of milk proteins and their biological function. **Journal of Dairy Science** **76**, 3062-3078.

SCOTT, R. (1991) La leche como materia prima para la fabricación del queso. En *Fabricación de Queso*. Acribia, S. A., Zaragoza. pp: 47-78.

SCHMIDT, D. G. (1982) Association of caseins and casein micelle structure. En *Developments in Dairy Chemistry-I. Proteins*. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers, London. pp: 61-86.

SCHUH, R., KREMER, E., EGO, E., WASILIU, M. y THIERFELDER, S. (1992). Determination of monoclonal antibody specificity by immunoadsorption and western blotting. **Journal of Immunological Methods** **152**, 59-67.

SINGH, H. y LATHAM, J. M. (1993). Heat stability of milk: aggregation and dissociation of protein at ultra-high temperatures. **International Dairy Journal** **3**, 225-237.

SKERRITT, J. H. y HILL, A. S. (1991). Self-management of dietary compliance in coeliac disease by means of ELISA "home test" to detect gluten. **The Lancet** **337**, 379-382.

SLATTERY, C. W. y EVARD, R. (1973). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. **Biochimica et Biophysica Acta** **317**, 529-538.

SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, B. L. y COOMANS, D. (1977). Application of linear discriminant analysis to differentiation of pure milk from different species and mixtures. **Association of Official Analytical Chemists** **60**, 1382-1385.

SPITZ, M., SPITZ, R., THORPE, R. y EUGUI, E. (1984). Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods** **70**, 39-43.

ST-MARTIN, M. y PAQUIN, P. (1990). Ion-exchange fast protein liquid chromatography: optimization of the purification of caseins using a non-denaturing detergent. **Journal of Dairy Research** **57**, 63-68.

SWAISGOOD, H. E. (1982). Chemistry of milk proteins. En *Developments in Dairy Chemistry*. P. F. Fox (ed.), Applied Science Publishers. pp: 1-59.

SWAISGOOD, H. E. (1993). Review and update of casein chemistry. **Journal of Dairy Science** **76 (10)**, 3054-3061.

TAYLOR, S. L. (1986). Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in humans. **Journal of Food Protection** **49** (3), 239-250.

THOMPSON, M. P. (1966). DEAE-cellulose-urea chromatography of casein in the presence of 2-mercaptoethanol. **Journal of Dairy Science** **49**, 792-795.

TOCHER, J. F. (1925). Variations in the composition of milk. H. M. Stationery Office, London.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. y GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** **76** (9), 4350-4354.

VARNAM, A. H. y SUTHERLAND, J. P. (1994). Nutritional status of cheese. En *Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology*. Vol. 1. Chapman & Hall (ed.), pp: 276-345.

VISSER, F. M. W. y de GROOT-MOSTERT, A. E. A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study. **Netherlands Milk & Dairy Journal** **31**, 247-264.

VREEMAN, H. J., BRINKHUIS, J. A. y VAN DER SPEK, C. A. (1981). Some association properties of bovine SH- κ -casein. **Biophysical Chemistry** **14**, 184-193.

WAUGH, D. F., SLATTERY, C. W. y CREAMER, L. K. (1971). Binding of cations to caseins: Site binding, donnan binding, and system characteristics. **Biochemistry** **10**, 817-823.

WAUGH, D. F. y VON HIPPEL, P. H. (1956). κ -casein and the stabilization of casein micelles. **Journal of American Chemical Society** **78**, 4576-4582.

WEI, T. M. y WHITNEY, R. M. (1985). Batch fractionation of bovine caseins with dimethylaminoethyl cellulose. **Journal of Dairy Science** **68**, 1630-1636.

WHITNEY, R. McL. (1988). Proteins of milk. En *Fundamentals of dairy chemistry*. Third edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York. pp: 81-169.

WINTER, G. y MILSTEIN, C. (1991). Man-made antibodies. **Nature** **349**, 293-299.

WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E. y HOOGENBOOM, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. **Annual Review of Immunology** 12, 433-455.

ZIN EL-DIN M. y TAKAYOSHI A. (1993). Polymerization of casein on heating milk. **International Dairy Journal** 3, 581-588.

ZISCHLER, H., NANDA, Y., SCHÄFER, R., SCHMID, M. y EPPLEN, J. T. (1989). Digoxigenated oligonucleotide fingerprinting and hybridization in situ. **Human Genetics** 82 (3), 227-233.